

Galektin-3 und TGF beta 1 assoziierte fibrokontraktive
Wundheilungsstörungen – Reexpression von fetalen Proteinen
während dermalen Regeneration

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Anne Kristin Attrodt
geboren am 12.01.1983 in Sonneberg**

Gutachter

- 1. Prof. Dr. Dr. Stefan Schultze-Mosgau, Jena**
- 2. Prof. Dr. Utz Settmacher, Jena**
- 3. Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert, Regensburg**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 1. September 2009

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A.d.	destilliertes Wasser
Akt	Serin/Threonin-Kinase, auch PKB (Proteinkinase B) genannt
α -SMA	Alpha-smooth muscle actin
ANOVA	Analysis of Variance
APAAP	Immunkomplex aus alkalischer Phosphatase und Anti-Alkalische Phosphatase
CPB-35	Carbohydrate Binding Protein-35
ECM	extrazelluläre Matrix
GSK3 β	Glycogen Synthetase Kinase 3-beta
Gy	Gray
IL-1,-5,-6,-8	Interleukine
IQR	Interquartile Range
LEF	Lymphoid Enhancer Factor
Mac-2	Macrophage galactose-specific lectin-2
NF κ B	Nuclear factor kappa B
NIH-3T3	Standard-Fibroblastenzelllinie aus embryonalen Mauskulturen
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika
PAP	Peroxidase und Anti-Peroxidase (Immunkomplex)
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
Tab.	Tabelle
TBS	Tris buffered saline
TCF	T-cell factor
THP1	human acute monocytic leukemia cell line
TGF β	Transforming growth factor beta
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	7
2. Einleitung	9
2.1. <i>Klinischer Hintergrund</i>	9
2.2. <i>Kenntnisstand</i>	10
2.2.1. Morphologische Veränderungen nach Bestrahlung	10
2.2.2. Wundheilung im bestrahlten Gewebe	11
2.2.3. Aufbau und Struktur von Galektin-3	12
2.2.4. Lokalisation und Gewebeverteilung von Galektin-3	14
2.2.5. Biologische Funktionen von Galektin-3	14
2.2.6. Galektin-3 in der Fibroseentwicklung	16
3. Ziele der Arbeit und Fragestellungen	17
4. Material und Methoden	18
4.1. <i>Tiermodell und Versuchsdesign</i>	18
4.1.1. Versuchstiergruppen	18
4.1.2. Präoperative Bestrahlung	18
4.1.3. Antikörperapplikation	19
4.1.4. Modell des freien myokutanen Gracilislappen	19
4.1.5. Transplantatlager der Halsregion	21
4.1.6. Transplantationstechnik	22
4.1.7. Probengewinnung	22
4.2. <i>Immunhistochemische Nachweisreaktion</i>	23
4.2.1. Probenaufbereitung	23
4.2.2. Methodenetablierung	23
4.2.3. Angewendete Methode	23
4.2.4. Immunhistochemische Färbung nach der LSAB-Methode	25
4.2.5. Verwendete Reagenzien	27
4.3. <i>Qualitative und quantitative Analyseverfahren</i>	28
4.3.1. Qualitative und semiquantitative Expressionsbestimmung	28
4.3.2. Statistische Analyse	28

5. Ergebnisse	29
5.1. <i>Tierexperimentelle Ergebnisse</i>	29
5.2. <i>Qualitative immunhistologische Ergebnisse</i>	29
5.2.1. Expression von Galektin-3 im unbestrahlten Gewebe	29
5.2.2. Expression von Galektin-3 im bestrahlten Gewebe	30
5.3. <i>Quantitative Resultate</i>	31
5.3.1. Galektin-3-Expression im unbestrahlten und bestrahlten Gewebe	31
5.3.2. Vergleich der Galektin-3-Expression im Übergangsbereich und im bestrahlten Halsgewebe	32
5.3.3. Galektin-3-Expression im Übergangsbereich	33
6. Diskussion	34
6.1. <i>Diskussion Tiermodell</i>	34
6.2. <i>Diskussion der immunhistochemischen Verfahren</i>	35
6.3. <i>Diskussion der Galektin-3-Expression</i>	35
6.3.1. Galektin-3-Expression im Gewebe	35
6.3.2. Galektin-3 und TGF β	37
6.3.3. Galektin-3 in der Signaltransduktion	38
7. Schlußfolgerung	40
8. Literaturverzeichnis	41
9. Anhang	41
9.1. <i>Färbeprotokoll</i>	48
9.2. <i>Lebenslauf</i>	49
9.3. <i>Danksagung</i>	50
9.4. <i>Ehrenwörtliche Erklärung</i>	51

1. Zusammenfassung

Wissenschaftlicher Hintergrund:

Nach Radiotherapie erhöht sich die Komplikationsrate mikrovaskulärer Weichgewebstransplantate bei Einheilung. Verminderte Vaskularisation und Fibroseinduktion kennzeichnen die Wundheilung im bestrahlten Gewebe. Das Zytokin TGF β , frühzeitig nach Bestrahlung dauerhaft aktiviert, ist maßgeblich an der Fibrogenese beteiligt. Eine vollständige Fibrosehemmung mittels anti-TGF β -Antikörper ist bisher nicht erzielt worden. Galektin-3, ein monomeres Glycoprotein, zeigt in bestrahlungsinduzierter Lungenfibrose, sowie Leber- und Nierenfibrose erhöhte Expressionswerte. Es ist ein Einfluss auf den Smad-Signalweg beschrieben und somit ein Einfluss auf die TGF β -vermittelte Fibroseentwicklung wahrscheinlich. So scheint Galektin-3 als embryonales Signalprotein an der Fibroseentwicklung beteiligt.

Fragestellung und Ziele:

Im vorliegenden Dissertationsprojekt wird die Galektin-3-Expression im Wundheilungsverlauf im unbestrahlten und bestrahlten Gewebe betrachtet. Die zytoplasmatische Expression im bestrahlten Halsgewebe wird mit der Expression des Übergangsbereiches zwischen Transplantat und Lager verglichen. Das Dissertationsprojekt untersucht den Einfluss der anti-TGF β -Applikation auf die Expression von Galektin-3.

Methodik:

Als Grundlage der Untersuchungen dient das etablierte Modell des freien myokutanen Gracilislappen im bestrahlten Transplantatlager. Vier Wochen nach Bestrahlung mit 40 Gy Gesamtdosis (n=44) beziehungsweise ohne vorherige Bestrahlung (n=8) erfolgt die mikrochirurgische Transplantation des myokutanen Transplantats von der Leiste in die Halsregion. Bei 21 Tieren wird zusätzlich zur Bestrahlung der Antikörper anti-TGF β appliziert. Am Operationstag sowie 14. postoperativen Tag werden Proben aus Leistenregion, Übergangsbereich zwischen Transplantat und Lager und kontralateraler Halsregion gewonnen. Mit einem immunhistochemischen Nachweisverfahren

(LSAB-Methode) wird die Galektin-3-Expression im Gewebe untersucht. Die Bestimmung der labelling indices ermöglicht die semiquantitative Analyse der Ergebnisse.

Ergebnisse und Diskussion:

Für die bestrahlungsinduzierte Lungenfibrose sowie Leber- und Nierenfibrose sind erhöhte Galektin-3-Expressionswerte bekannt. Die Dissertationsergebnisse zeigen im Übergangsbereich zwischen vorbestrahlten Transplantatlager und Transplantat sowie bestrahltem kontralateralen Halsgewebe gegenüber der unbestrahlten Leistenregion signifikant erhöhte Expressionswerte. Es wird die Reexpression fetaler Antigene wie Galektin-3 bei bestrahlungsinduzierter Fibrose vermutet.

Unabhängig von der Applikation des anti-TGF β -Antikörpers bleibt die Galektin-3-Expression im bestrahlten Transplantatlager erhöht. Dies zeigt die Unabhängigkeit der Galektin-3-Expression von TGF β . Trotz gleich bleibender TGF β -Konzentration sind bei Galektin-3-knock out Maus Kollagendeposition und α -SMA als Marker der Myofibroblastenaktivierung in Leber- und Nierenfibrose reduziert. Galektin-3 scheint durch Modulation der TGF β vermittelten Myofibroblastenaktivierung und Matrixproduktion an der Fibroseentwicklung beteiligt.

Schlussfolgerung:

Im Hinblick auf die Fibroseentwicklung stellt Galektin-3 einen neuen Interpretationsansatz dar. Seine Rolle in diesem komplexen Prozess bedarf weiterer Forschung. Sowohl eine Modulation wie auch die TGF β -unabhängige downstream-Aktivierung (Smad2/3) der Effektoren des TGF β -Weges bei der Fibroseprogression sind denkbar. Eine Relativierung der bisher angenommenen Rolle von TGF β als Schlüsselprotein der Fibroseentwicklung deutet sich an. Galektin-3-Interaktionen mit dem Wnt-Signalweg, Akt und NF κ B sind bekannt. Genaue Funktionsweisen in Signaltransduktionsmechanismen müssen weitere Untersuchungen klären.

2. Einleitung

2.1. Klinischer Hintergrund

Freie mikrovaskuläre Gewebetransplantate finden in einer Vielzahl von medizinischen Gebieten Anwendung, wobei die Tumorchirurgie den größten Anteil trägt. Die Verwendung von Transplantaten ermöglicht nach radikaler Tumorentfernung die primäre Rekonstruktion. Im Kopf-Hals-Bereich haben sich freie Transplantate zu Standardtherapiemaßnahmen entwickelt (Aitasalo et al. 1997a, Urken et al. 2001).

Im Rahmen der Tumorbehandlung kommen multimodale Therapiekonzepte wie prä- oder postoperative Radiotherapie in Kombination mit Chemotherapie zum Einsatz. Der Einfluss präoperativer Bestrahlung auf den Verlust des Transplantats wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Belegt ist die beeinträchtigte Vaskularisation durch präoperative Bestrahlung im Transplantatlager (Schultze-Mosgau et al. 2002a). Es resultiert eine verzögerte Einheilung des gut perfundierten Transplantats. Komplikationen ergeben sich im Übergangsbereich zwischen Transplantat und Transplantatbett (Singh et al. 1999). Abbildung 1 zeigt eine Wundheilungsstörung im Kopf-Hals-Bereich mit freiliegender Überbrückungsplatte nach Transplantatverlust.

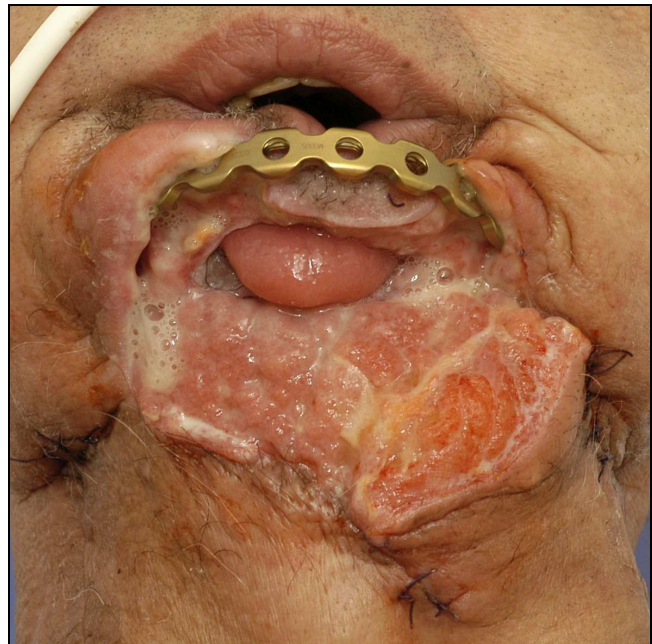


Abb. 1: Wundheilungsstörung im Kopf-Hals-Bereich mit Teilverlust des Transplantats

Wundheilung im vorbestrahlten Gewebe ist gekennzeichnet durch die verminderte Vaskularisation, gesteigerte Apoptose von Endothelzellen und Fibroblasten sowie die Fibroseinduktion durch vermehrte Matrixsynthese (Dormand et al. 2005). Durch die Bestrahlung aktivierte Zytokine wie IL-1, IL-6, TNF α und TGF β sind wichtige Bestandteile im Rahmen der bestrahlungsbedingten Gewebeveränderungen (Muller und Meineke 2007). Sie interagieren in einem komplexen Netzwerk mit Entzündungszellen, Bindegewebszellen und Fibroblasten. TGF β ist hierbei mittels Signaltransduktion über Smad-Proteine maßgeblich an der Fibroseentwicklung beteiligt (Verrecchia und Mauviel 2007). Allerdings hat die Applikation von anti-TGF β als potentieller therapeutischer Ansatz der Fibrosehemmung keinen dauerhaften Erfolg erzielen können (Schultze-Mosgau et al. 2006). Aktuelle Untersuchungen beziehen die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) in die Betrachtung der Fibroseentwicklung ein (Kalluri und Neilson 2003). So hat sich gezeigt, dass eine Gewebeschädigung zur Umwandlung epithelialer Zellen in einen mesenchymalen Phänotyp führt. Die EMT ist in der Embryonalentwicklung als wichtiger Mechanismus beschrieben (Hay 1995). Für die bestrahlungsinduzierte Lungenfibrose zeigt sich die Reexpression des Proteins Galektin-3. Es scheint als embryonales Signalprotein an der Fibroseentwicklung beteiligt. Trotz gleich bleibender TGF β -Konzentration ist eine Reduktion der Leber- und Nierenfibrose der Galektin-3-knockout Maus gezeigt (Henderson et al. 2006, Henderson et al. 2008). Dies lässt eine Mitwirkung von Galektin-3 bei der TGF β -vermittelten Myofibroblastenaktivierung und Kollagenproduktion vermuten.

Ziel des Dissertationsprojektes ist die deskriptive und semiquantitative Analyse der Galektin-3-Expression in vorbestrahlter Haut im Vergleich zum unbestrahlten Gewebe am Rattenmodell des freien myokutanen Gracilislapen. Weiterhin soll der Einfluss einer anti-TGF β -Applikation in das Transplantatlager auf die Galektin-3-Expression untersucht werden.

2.2. Kenntnisstand

2.2.1. Morphologische Veränderungen nach Bestrahlung

Bestrahlung führt zu Sofortreaktionen und Spätfolgen an Haut und subkutanen Gewebe mit Auswirkungen auf die Wundheilung. Das Verlustrisiko freier mikrovaskulärer Transplantate nach präoperativer Radiotherapie ist erhöht (Aitasalo et al. 1997b). Es steigt dosisabhängig an (Schultze-Mosgau et al.

2001). Komplikationen bei bestrahlten und unbestrahlten Patienten werden unterschiedlich interpretiert. Einige Studien geben ähnliche Komplikationsraten an. Eine Untersuchung von Klug et al hat einen Anstieg der Komplikationsraten von 12,7% bei unbestrahlten Patienten auf 23,9% bei präoperativer Radiotherapie ergeben (Klug et al. 2006). Zudem haben Singh et al zeigen können, dass präoperative Radiotherapie als einziger Faktor mit einem erhöhten Risiko für Komplikationen im Bereich des Transplantatbettes einhergeht (Singh et al. 1999). Schultze-Mosgau et al sehen die Veränderungen der Vaskularisierung und Fibrosierung des Transplantatlagers als limitierenden Faktor der Wundheilung. In Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis und der Zeit nach Radiotherapie kommt es zur Verringerung der Kapillardichte (Schultze-Mosgau et al. 2002a). Arterien in vorbestrahltem Gewebe zeigen dosisabhängig qualitative Veränderungen wie Mediahyalinisierung und Intimadegeneration (Schultze-Mosgau et al. 2000). Das Thromboserisiko, das die Gefahr des Transplantatverlustes erhöht, steigt (Dormand et al. 2005). Durch die Bestrahlung kommt es zu funktionellen Veränderungen der Fibroblasten mit verminderter Proliferation und reduzierter Kollagendeposition. Im Verlauf zeigt sich eine gesteigerte Kollagensynthese. Es ergeben sich Spätfolgen wie Gewebeatrophie, Kontrakturen und fibröser Gewebeumbau (Tibbs 1997).

2.2.2. Wundheilung im bestrahlten Gewebe

Neben DNA-Schäden aktiviert Radiotherapie multiple Zellsysteme. Proinflammatorische Zytokine wie IL-1 und TNF α führen zur transendothelialen Migration von Entzündungszellen. Neutrophile Granulozyten und Makrophagen mit Phagozytosefähigkeit sammeln sich im Gewebe als klassische Zeichen einer Entzündungsreaktion.

TGF β wird frühzeitig nach Bestrahlung dauerhaft aktiviert. In inaktiver Form liegt es nichtkovalent gebunden an latency associated peptide (LAP) vor. Durch Bindung an entsprechende transmembrane Seronin-Threonin-Rezeptoren vermittelt es intrazellulär die Phosphorylierung und Aktivierung der Smad-Proteine. Der aktivierte Smad-Komplex transloziert in den Zellkern und beteiligt sich an der Transkriptionsmodulation TGF β -abhängiger Zielgene. Im Rahmen der Wundheilung führt TGF β zu Chemotaxis von Mastzellen, Fibroblasten,

Monozyten sowie Makrophagen, Proliferation und Stimulation von Fibroblasten mit gesteigerter Synthese von ECM-Komponenten wie Kollagen und Fibronectin. Aktivierte Fibroblasten wandeln sich in α -SMA-exprimierende Myofibroblasten. Als weitere Ressourcen für Myofibroblasten dienen Knochenmark und die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT). Die EMT, im Rahmen der embryonalen Entwicklung und Tumormetastasierung intensiv untersucht, vollzieht sich infolge epithelialer Schädigung (Hay 1995, Yanjia und Xinchun 2007). In einem mehrstufigen Prozess wandeln sich Epithelzellen zu Zellen mit mesenchymalem Phänotyp. Die Suppression des epithelialen Marker E-Cadherin geht mit Destabilisierung des Epithelverbandes einher. Es kommt zur de-novo Expression von α -SMA sowie Aktinreorganisation. Die Störung der strukturellen und funktionellen Integrität der Basalmembran erlaubt die Zellmigration in subepitheliales Gewebe (Liu 2004). Snail, als Faktor der embryonalen Gewebe- und Organdifferenzierung wird im Rahmen der Nierenfibrose reexprimiert (Boutet et al. 2007). Die EMT ist bei fibrösen Umbauvorgängen in Niere, Leber und Linse bereits beschrieben (Liu 2004, Ikegami et al. 2007, Saika et al. 2004). Die Mechanismen der EMT sind nicht vollständig geklärt. Eine Vielzahl von Signalwegen scheint am Prozess der Zellumwandlung beteiligt. Neben dem TGF β -Signalweg scheinen noch mitogen-activated protein kinase (MAPK), nuclear factor- κ B (NF- κ B), PI3K-Akt und wingless type (Wnt) an der TGF β -vermittelte EMT beteiligt (Kalluri und Neilson 2003).

2.2.3. Aufbau und Struktur von Galektin-3

Galektin-3, ein monomeres Protein von 29 - 35kDa, ist seit 1994 unter diesem Namen bekannt. Synonym werden verschiedene Bezeichnungen nach Funktionsweise wie Mac-2 oder CBP-35 verwendet, die mit Einführung einer Nomenklatur als Galektin-3 zusammengefasst werden. Galektine sind durch ihre evolutionär erhaltene Aminosäuresequenz und das Erkennen von β -Galaktosidstrukturen definiert (Barondes et al. 1994). Unter den drei Hauptgruppen stellt Galektin-3 das Einzige vom chimera Typ dar. Es ist durch zwei funktionelle Domänen gekennzeichnet. Die N-terminale Domäne (ND) besteht speziesabhängig aus 100-150 Aminosäureresten mit repetitiven Sequenzen von 7-14 Aminosäureresten (Krzslak und Lipinska 2004). Die Carbohydrate-recognition-domain (CRD) mit etwa 130 Aminosäuren beinhaltet

die Kohlenhydratbindungsseite und ist somit für die lektinspezifische Aktivität verantwortlich (Hsu et al. 1992, Ochieng et al. 1993). Durch Kristallstrukturanalyse konnte der Aufbau aus zwei antiparallelen β -sheets bestehend aus fünf beziehungsweise sechs β -Strängen gezeigt werden. Die 3D-Struktur gestaltet sich mit 20-25% Sequenzübereinstimmung ähnlich den Homodimeren Galektin-1 und -2 (Seetharaman et al. 1998). Zu bevorzugten Bindungspartnern von Galektin-3 zählen N-Acetyllactosamine (Agrwal et al. 1993). Durch seine verlängerte Bindungsseite können längere Oligosaccharide gebunden werden (Knibbs et al. 1993). Die Bindung ist durch Laktose hemmbar. Mit unglykosylierten Molekülen interagiert Galektin-3 über Protein-Protein-Bindungen (Dumic et al. 2006). Trotz des monomeren Aufbaus besitzt Galektin-3 multivalente Bindungseigenschaften (Knibbs et al. 1993). Sowohl CRD wie auch ND sind an der Bildung von Multimeren beteiligt. In Gegenwart multivalenter Liganden ist eine pentamere Formation von Galektin-3-Molekülen gezeigt worden. Diese scheint durch die N-terminale Domäne vermittelt (Ahmad et al. 2004).

Das humane Galektin-3 ist durch ein einzelnes Gen LGALS3 auf dem Chromosom 14 locus q21-q22 lokalisiert (Raimond et al. 1997). Dieses ist aus sechs Exons und fünf Introns aufgebaut (Abb. 2). Exon I verschlüsselt den Hauptanteil der 5'untranslierten Region der mRNA, Exon II den übrigen Anteil. Die N-terminale Domäne wird durch Exon III verschlüsselt. Im humanen Genom liegt die verschlüsselnde Sequenz für die CRD auf Exon V, bei der Maus auf Exon IV, V, VI (Gritzmacher et al. 1992, Kadrofske et al. 1998).

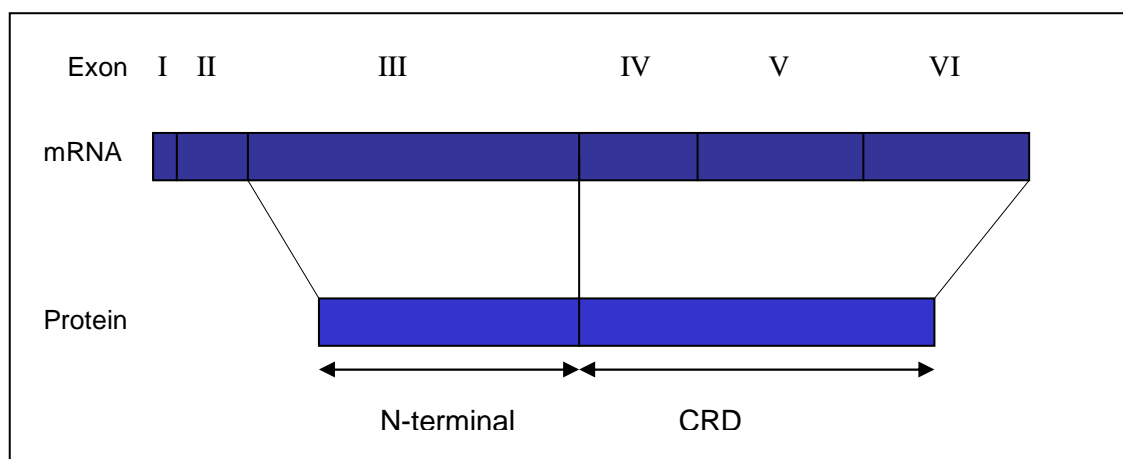


Abb. 2: Verschlüsselung von Galektin-3 auf dem LGALS3-Gen
(Krzeslak und Lipinska 2004)

2.2.4. Lokalisation und Gewebeverteilung von Galektin-3

Galektin-3 wird an den freien Ribosomen im Cytoplasma synthetisiert (Krzeslak und Lipinska 2004). Es ist im Cytoplasma, im Kern und extrazellulär lokalisiert (Dumic et al. 2006). Der Transport in den extrazellulären Raum (EZR) erfolgt nicht über den ER/Golgi-Weg. Hughes vermutet einen Export über spezifische Vesikel (Hughes 1999). Durch laktoseabhängige Endozytose kann Galektin-3 vom EZR in den intrazellulären Raum (IZR) transportiert werden (Furtak et al. 2001). Der Kernimportmechanismus ist weitgehend ungeklärt.

Im adulten Gewebe wird Galektin-3, ähnlich der embryonalen Expression, überwiegend in Epithelzellen, Myeloid- und Amoeboidezellen exprimiert. Es kann im Epithel von Darm, Kolon, Kornea, Konjunktiva, Leber, Lunge, Brust und Prostata nachgewiesen werden. Desweiteren zeigen Fibroblasten, Chondrocyten, Osteoblasten und -klasten, Keratinocyten, die Magenmucosa und Endothelzellen verschiedener Organe eine Galektin-3-Expression. Im Rahmen der Immunantwort liegt bei Granulocyten, Mastzellen, Langerhanszellen, dendritischen Zellen, Monocyten und Makrophagen eine Galektin-3-Expression vor (Dumic et al. 2006). Im Tumorgewebe ist der Expressionsgrad abhängig von Gewebetyp, Tumorprogression, Invasivität und metastatischer Aktivität (van den Brule et al. 2004, Takenaka et al. 2004).

2.2.5. Biologische Funktionen von Galektin-3

Liu et al haben bei Differenzierung humaner Monocyten in Makrophagen in vitro einen signifikanten Anstieg der Galektin-3 Expression nachweisen können (Liu et al. 1995). Ebenso sind erhöhte Expressionswerte in phagozytischen Makrophagen gezeigt worden (Elliott et al. 1991). Die Aktivierung von humanen Monocyten mit Lipopolysacchariden und Interferon γ ist mit einer Reduktion der Galektin-3-Expression verbunden (Liu et al. 1995). Dies deutet auf unterschiedliche Regulationsmechanismen abhängig von Zelltyp und spezifischen physiologischen beziehungsweise pathologischen Rahmenbedingungen hin. Die Mechanismen der Expressionsregulation sind erst teilweise verstanden. Durch die Fähigkeit Oberflächenglycoproteine und glycosylierte Komponenten der extrazellulären Matrix zu binden, hat Galektin-3 modulatorische Einflüsse auf die Zelladhäsion. Es ist als Bindungspartner von Laminin, Fibronectin, Elastin, Kollagen IV, Tenascin C und R identifiziert worden

(Dumic et al. 2006). Galektin-3 unterstützt die Adhäsion humaner neutrophiler Granulocyten an Laminin und Endothelzellen und ist so an der inflammatorischen Antwort beteiligt (Kuwabara und Liu 1996, Sato et al. 2002). In vivo und in vitro induziert Galektin-3 die Migration von Monocyten und Makrophagen (Sano et al. 2000). In neutrophilen Granulocyten und Monocyten triggert das Lektin die Produktion von Superoxidanionen und potentierte die Lipopolysaccharid-induzierte Produktion von IL-1 (Yamaoka et al. 1995). In ruhenden Lymphozyten liegt keine oder nur geringe Galektin-3-Expression vor. Eine gesteigerte Expression lässt sich hingegen in aktierten B-Lymphozyten und bei deren Differenzierung zu Plasmazellen nachweisen (Acosta-Rodriguez et al. 2004). Humane Jurkat-T-Lymphomzellen, die mit Galektin-3 transfiziert worden sind, weisen gesteigerte Wachstumsraten auf (Yang et al. 1996). Das Lektin zeigt zahlreiche Interaktionen mit Entzündungszellen. Bestimmte Zellen produzieren und sezernieren Galektin-3 als Reaktion auf verschiedene inflammatorische Stimuli. In humanen eosinophilen Granulocyten führt die Galektin-3-Exposition zur selektiven Hemmung der IL-5-Expression (Cortegano et al. 1998). Eine Galektin-3 knock-out Maus entwickelt im Asthmodell gegenüber dem Wildtyp weniger eosinophile Granulocyten und eine signifikant geringere Hyperreagibilität der Atemwege (Zuberi et al. 2004). In ruhenden humanen Lungenfibroblastenkulturen haben Inohara et al durch Zugabe von Galektin-3 eine Stimulation der DNA-Synthese und Zellproliferation beobachtet (Inohara et al. 1998). Zudem zeigt sich in synovialen Fibroblasten eine erhöhte Galektin-3-Expression bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (Neidhart et al. 2005). Bei antiinflammatorischer Therapie mit NSAR und Kortikosteroiden ergeben sich in monozytischen THP-1-Zellen verminderte Galektin-3 Werte. Auch für Endothelzellen ist eine Galektin-3 Wirkung nachgewiesen (Kim et al. 2003). Es induziert in vivo und in vitro Morphogenese und Angiogenese endothelialer Zellen (Nangia-Makker et al. 2000).

Abbildung 3 fasst wichtige Funktionen von Galektin-3 schematisch zusammen.

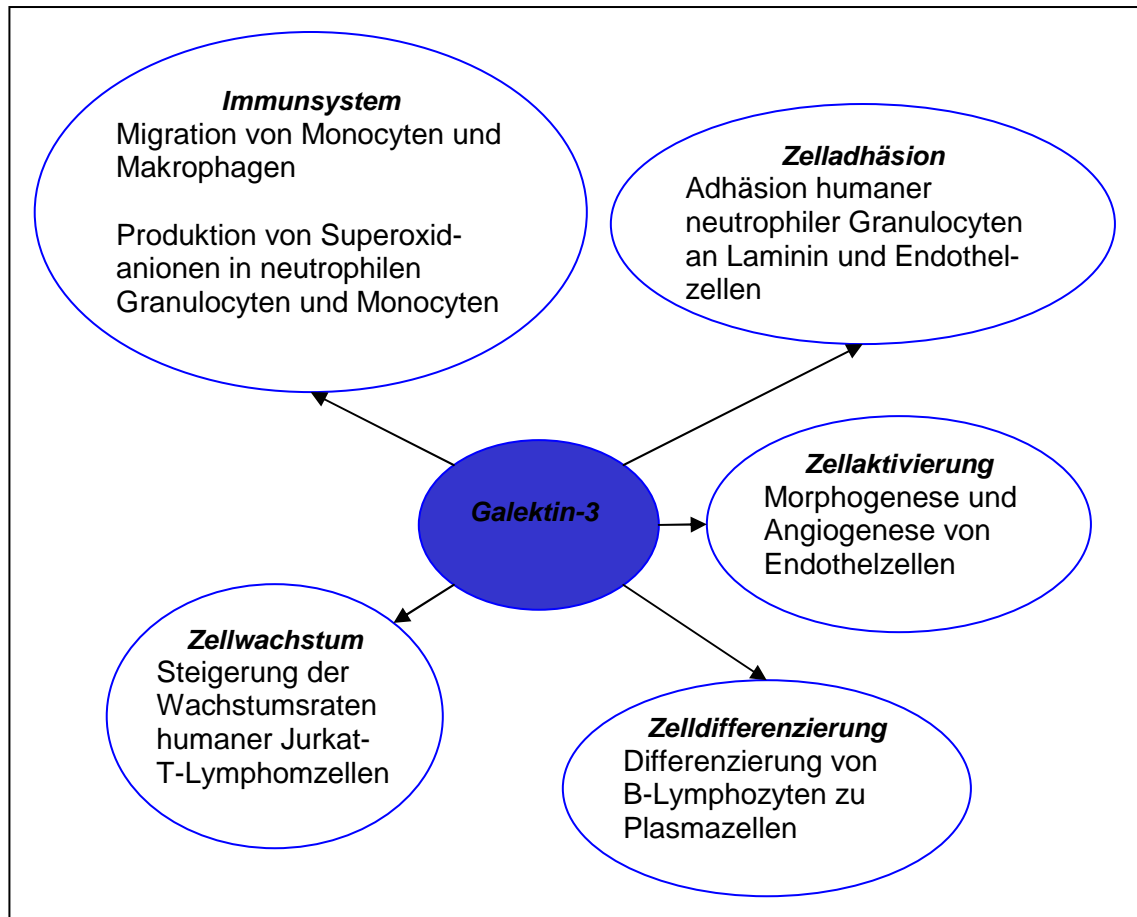


Abb. 3: Biologische Funktionen von Galektin-3

2.2.6. Galektin-3 in der Fibroseentwicklung

Am Rattenmodell ist 1996 eine erhöhte Galektin-3-Expression in der bestrahlungsinduzierten Lungenfibrose nachgewiesen worden. Vier Wochen nach Bestrahlung zeigen sich Galektin-3-positive Myofibroblasten. Die zytoplasmatischbetonte Verteilung in Makrophagen im gesunden Gewebe wandelt sich in eine zelloberflächenbetonte Galektin-3-Expression (Kasper und Hughes 1996). In der bronchoalveolären Lavage bei Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose liegen erhöhte Galektin-3-Konzentrationen vor. Galektin-3 induziert die mRNA-Expression sowie Proteinproduktion von TNF α und IL-8 in THP1-Makrophagen. In vitro stimuliert Galektin-3 NIH-3T3-Fibroblasten zur Migration und Kollagenproduktion (Nishi et al. 2007).

Im Darm werden Fibroblasten der Lamina propria durch lösliches Galektin-3 aktiviert. Sie spielen in der Pathogenese von Morbus Crohn und Fibrose eine Rolle (Lippert et al. 2007). Am Herz induziert Galektin-3 die kardiale Fibroblastenproliferation und Kollagendeposition. Es ist somit an der

Entwicklung kardialer Dysfunktionen beteiligt (Sharma et al. 2004). Im reversiblen Modell der Leberfibrose an Ratten besteht ein zeitlicher und räumlicher Zusammenhang der Galektin-3-Expression zur Fibrose. Es zeigt sich acht Wochen nach Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff periportal und in Feldern mit überbrückender Fibrose eine erhöhte Galektin-3-Expression. Eine Galektin-3-Färbung liegt in der Peripherie der geschädigten Felder vor. Die Myofibroblastenaktivierung und Kollagenablagerung erfolgt nach gleichem Verteilungsmuster wie die vorliegende Galektin-3-Expression. Die Unterbrechung der Galektin-3-Gene reduziert die Leberfibrose in vivo und in vitro trotz gleich bleibender TGF β -Expression (Henderson et al. 2006). Dies ist analog für die Nierenfibrose belegt. Bei Nierenobstruktion können Galektin-3^{-/-} Makrophagen trotz normaler Rekrutierung keine Myofibroblastenaktivierung erzielen. Henderson et al zeigen, dass Galektin-3-Expression und –Sekretion an der Entwicklung der Nierenfibrose beteiligt ist. Dies legt einen bisher wenig untersuchten Zusammenhang zwischen immunologischer Situation und Fibroseprogression nahe.

3. Ziele der Arbeit und Fragestellungen

Galektin-3 zeigt sich in der Fibrose von Lunge, Leber und Niere erhöht. Im Folgenden soll die Galektin-3-Expression im Rahmen der Transplantation eines mikrovaskulären Weichgewebstransplantats in ein vorbestrahltes Lager evaluiert werden. Es wird sowohl bestrahltes wie auch unbestrahltes Gewebe untersucht. Der Fokus liegt auf dem Expressionsverhalten von Galektin-3 nach Applikation von anti-TGF β -Antikörper. Die Ziele des vorliegenden Dissertationsprojektes lassen sich in folgenden Fragestellungen zusammenfassen:

1. Wie verhält sich die Galektin-3-Expression im Wundheilungsverlauf im unbestrahlten beziehungsweise bestrahlten Gewebe?
2. Besteht eine differentielle Galektin-3-Expression zwischen Übergangsbereich des Transplantats und bestrahltem Halsgewebe?
3. Besteht ein Einfluss der anti-TGF beta 1 Applikation auf die Expression von Galektin-3?

4. Material und Methoden

4.1. Tiermodell und Versuchsdesign

Die Proben der Versuchstiere lagen zu Dissertationsbeginn vor und stammen aus dem etablierten Modell der Wistarratte der Forschungsgruppe Schultze-Mosgau/ Wehrhan in den Jahren 1999 bis 2006 aus Erlangen und Jena. Im Folgenden soll auf die Vorbehandlung der Tiere, das Transplantationsmodell eines freien myokutanen Gracilislappen sowie die Probengewinnung eingegangen werden.

4.1.1. Versuchstiergruppen

Die Versuchstiere lassen sich abhängig vom jeweiligen Vorgehen in verschiedene Kategorien einteilen.

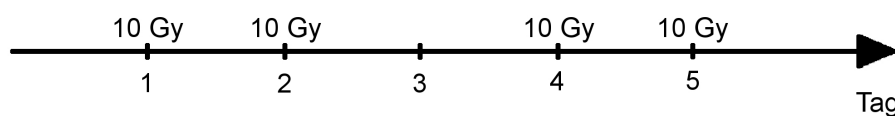
1. Gruppe: präoperative Bestrahlung und Antikörperapplikation, Transplantationsoperation (n=21)
2. Gruppe: präoperative Bestrahlung, Transplantationsoperation (n=23)
3. Gruppe: Transplantationoperation (n=8)

4.1.2. Präoperative Bestrahlung

Die Bestrahlung erfolgte mittels Linearbeschleuniger mit 6 MeV-Photonen und einem Fokus von 1cm² (Siemens Mevatron 67, Siemens, Erlangen, Deutschland).

Das Bestrahlungsfeld beider Halsseiten betrug jeweils 5 × 5 cm und wurde durch Tätowierung markiert. Als Grenzen dienten kranial die Manibula und kaudal die Klavikula. Trachea, Ösophagus und Rückenmark wurden mittels Bleiplatten vor der Bestrahlung geschützt. Der Abstand zwischen Bestrahlung und anschließender Transplantation betrug 4 Wochen. Die Bestrahlung wurde in Inhalationsnarkose bei einer Isoflurankonzentration (Forene, Abbott, Wiesbaden, Deutschland) von 1,3-1,5 Vol % durchgeführt.

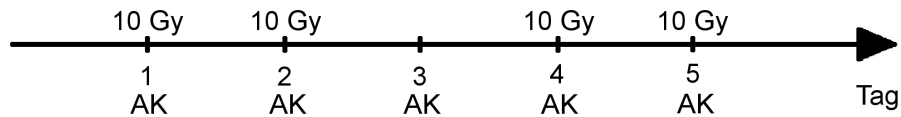
Die perkutane Bestrahlung erfolgte nach folgendem Schema:



Bei einer Einzelstrahlendosis von je 10 Gy ergibt sich eine Gesamtreferenzdosis von 40 Gy.

4.1.3. Antikörperapplikation

Bei 34 Tieren erfolgte parallel zur Bestrahlung die Antikörperapplikation mit anti-TGF β . Diese fand analog zur Bestrahlungsnarkose in Inhalationsnarkose statt. Hierzu lässt sich vorhergehendes Schema folgendermaßen ergänzen:



Der Antikörper wurde fünfmal zu je fünf μ g direkt in das spätere Transplantatlager appliziert.

4.1.4. Modell des freien myokutanen Gracislappen

Für die Versuchsreihe wurde das von Schultze-Mosgau et al etablierte Modell des modifizierten freien myokutanen Gracislappen verwendet.

Hierbei handelt es sich um ein 2,5 \times 2,5 cm messendes Transplantat der rechten Leistenregion, das nach Modifikation der Technik von Yim den muskulären Anteil des M. semitendinosus sowie A. und V. saphena einbezieht (Yim et al. 1991). Abb. 5 zeigt einen Überblick der Transplantatstrukturen einschließlich der vaskulären Versorgung.

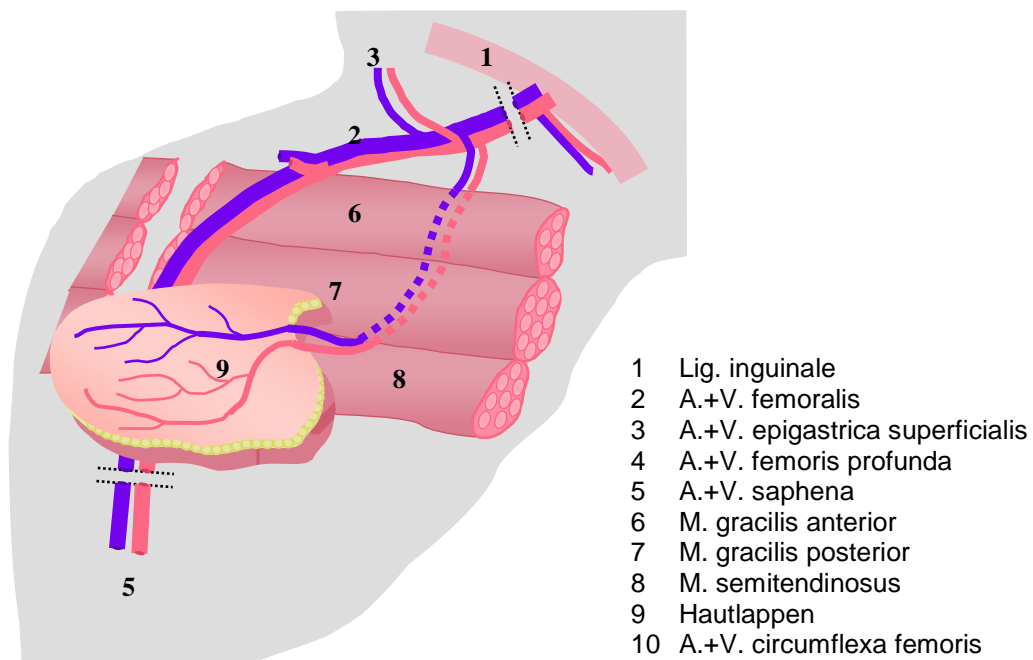


Abb. 4: Anatomie des freien myokutanen Gracislappens (Schultze-Mosgau et al. 2001)

Nach Narkoseeinleitung mittels 3,5-4,5 Vol % Isofluran (Forene, Abbott, Wiesbaden, Deutschland) über einen Gasverdampfer mit reinem Sauerstoff als Trägersubstanz, erfolgte die intramuskuläre Applikation 0,5 ml einer Ketavet/Rompun-Kombination (Ketavet, Pharmica & Upjohn, Erlangen, Deutschland; Rompun 2%, Bayer, Leverkusen, Deutschland) im Verhältnis 2:1 intraperitoneal. Intraoperativ wurden nochmals 0,5 ml zur Aufrechterhaltung der nötigen Narkosetiefe appliziert.

Zunächst wurde das Tier in Rückenlage mit abduzierten Extremitäten fixiert. Hals- und Leistenregion wurden rasiert. Die mediale Lappengrenze lag kaudal des Ligamentum inguinale. Lateral wurde der Lappen durch den Ansatz des M. gracilis begrenzt.

Nach Hautinzision des Areals und Überprüfen der Rekapillarisation wurde die Haut mit Einzelknopfnähten an die muskulären Strukturen angeheftet. A. und V. femoralis wurden identifiziert, vom Ligamentum inguinale bis zum proximalen Rand des anterioren M. gracilis dargestellt, ebenso A./V. profunda femoris sowie A./V. saphena und anschließend die muskulären Anteile sowie A./V. profunda femoris medial abgesetzt. Lateral wurde der Lappen 2-3 mm vor dem Muskelansatz an der Femurvorderkante abgetrennt, wobei A./V. saphena peripher ligiert und in den Lappen einbezogen wurden.

Die Entwicklung des Lappens erfolgte von peripher nach zentral.

Ebenso wurden die Poplitealgefäße und A./V. epigastrica superior ligiert. Die Blutversorgung wurde mit A./V. femoralis, A./V. profunda femoris sowie A./V. saphena gesichert. Die durchschnittliche Länge des Gefäßstiels betrug 1,5 - 2 cm. Zuletzt wurden A. und V. femoralis kaudal des Ursprungs der A./V. circumflexa femoris abgesetzt und dienten als Transplantatgefäße.

Um das Risiko intravaskulärer Thrombenbildung zu minimieren, wurde das Transplantat mit Heparinlösung (1:100000 Liquemin N 25000, Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) gespült. Die Wunde wurde einschichtig mit Einzelknopfnähten (4/0 Vicryl, Ethicon) verschlossen.

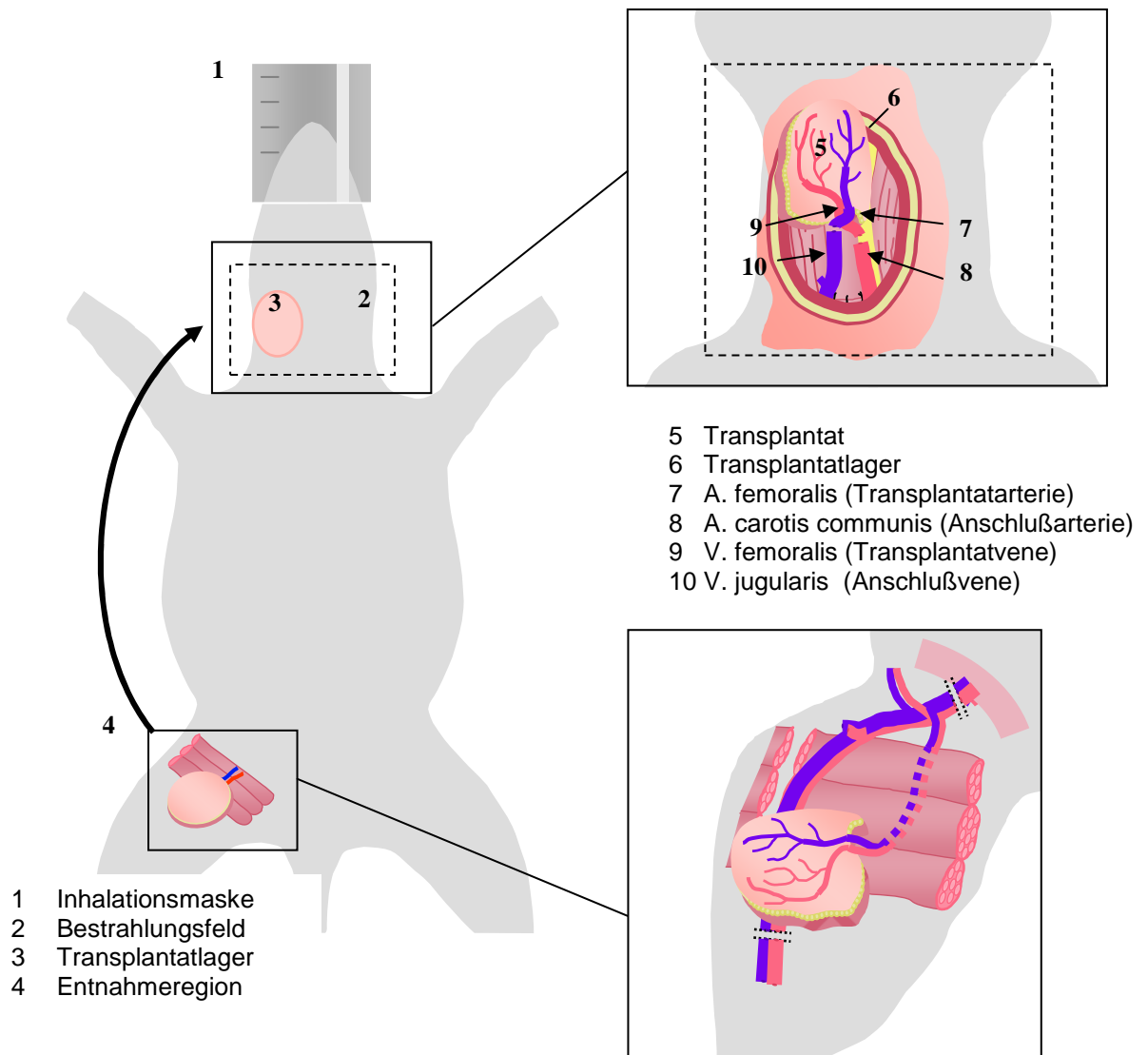


Abb. 5: Entnahme und Verpflanzung des freien myokutanen Gracilislappons von der rechten Leiste in den Halsbereich (Schultze-Mosgau et al. 2001)

4.1.5. Transplantatlager der Halsregion

Um die klinische Ausgangssituation möglichst realistisch nachzustellen, wurde in der rechten Halsregion ein 3 × 3 cm großer Resektionsdefekt geschaffen und ein Lager für das myokutane Transplantat vorbereitet.

Nach Resektion der Haut und des Panniculus carnosus wurde die V. jugularis als venöses Anschlussgefäß präpariert. Um vaskuläre Spasmen und Thrombosierung zu verhindern, erfolgte die Absetzung des Gefäßes erst unmittelbar vor Anastomisierung. Zur Imitation der modifizierten Neck dissection wurden M. sternocleidomastoideus, M. omohyoideus, Fettgewebe sowie die Glandula submandibularis reseziert. Als arterielles Anschlussgefäß diente die A. carotis.

4.1.6. Transplantationstechnik

Für die mikrochirurgischen Anastomosen wurde ein Stufenmikroskop (OPMI 1-FC, Zeiss, Jena, Deutschland) mit 20-25facher Vergrößerung verwendet. Die Methode entsprach der von Acland angewendeten mikrochirurgischen Technik zur Anastomisierung (Acland 1974).

Unter Zuhilfenahme einer Approximatklemme (Schließkraft 0,25-0,30 N, FD6152, Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) wurden A. femoralis und A. carotis mit Einzelknopfnähten (11/0, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) anastomosiert. Die venöse End-zu-End-Anastomose entstand zwischen V. femoralis und V. jugularis ebenfalls mit Einzelknopfnähten (11/0, Ethicon, Norderstedt, Deutschland).

Der durchschnittliche arterielle Gefäßdurchmesser betrug 1-2 mm, der Venendurchmesser 1,5-2,5 mm.

Die Gefäßlumina wurden mit Heparinlösung gespült (1:10, Liquemin N 25000, Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland). Um vaskulären Spasmen aufgrund mechanischer Irritation vorzubeugen, erfolgte eine Wässerung der anastomosierten Gefäße mit 10%iger Lidocainlösung. Das Überprüfen der Anastomosen erfolgte mittels Ausstreichtest und visueller Kontrolle der Rekapillarisation der Haut sowie Blutung aus muskulären und kutanen Lappenanteilen. Nach 10minütigem Zuwarten und erneutem Prüfen wurde die Transplantathaut mit Einzelknopfnähten (6/0 Prolene, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) in den Halsbereich eingenäht.

Die Gesamtoperationsdauer lag zwischen 2 und 2,5 Stunden.

4.1.7. Probengewinnung

Die Gewebeproben werden spindelförmig aus der jeweiligen Entnahmeregion exzidiert. Unmittelbar nach Entnahme erfolgt das Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff. Bis zur weiteren Aufarbeitung werden die Proben bei -80°C asserviert.

4.2. Immunhistochemische Nachweisreaktion

4.2.1. Probenaufbereitung

Die Fixation erfolgt mit 4%-iger Formaldehydlösung (phosphatgepuffert; pH 7,6; 4°C) mit sechs Stunden Fixationsdauer. Nach der Dehydratation werden die Proben in Paraffin eingebettet. Die Gewebeschnitte werden als Längsschnitte (2 µm Schichtdicke) senkrecht zum Verlauf des Übergangsbereiches zwischen Transplantat und Lager und senkrecht zur Hautoberfläche angefertigt.

4.2.2. Methodenetablierung

Zur Detektion der Galektin 3 - Expression im entsprechenden Probenmaterial werden die Avidin-Biotin-Peroxidase-Methode (ABC-POX-Methode) und die Labelled Streptavidin-Biotin-Methode (LSAB-Methode) vergleichend erprobt. Das verwendete Färbekit DakoREAL Detektion System basierend auf der LSAB-Methode zeigt ein sensitiveres Färbeergebnis, so dass dieses Verfahren anhand des Probenmaterials etabliert wird.

4.2.3. Angewendete Methoden

ABC-POX-Methode

Die Avidin-Biotin-Peroxidase-Methode als indirektes Detektionsverfahren nutzt die hohe Affinität von Avidin zu Biotin. Der mehrstufige Ablauf ist in Abbildung 6 schematisch dargestellt. Nach Bindung des Primärantikörpers an das entsprechende Epitop erfolgt die Inkubation mit einem biotinylierten Sekundärantikörper. Biotin, ein wasserlösliches Vitamin, eignet sich optimal zur Kopplung an den Brückenantikörper. Als dritter Schritt wird der Avidin-Biotin-Enzymkomplex zugesetzt. Im verwendeten Komplex ist die Bindung von drei Biotinmolekülen pro Molekül Avidin möglich. Somit können sowohl der biotinmarkierte Sekundärantikörper als auch die biotinmarkierten Meerrettichperoxidasemoleküle binden. Abschließend erfolgt die chromogene Nachweisreaktion durch enzymatische Umsetzung eines Farbsubstrats.

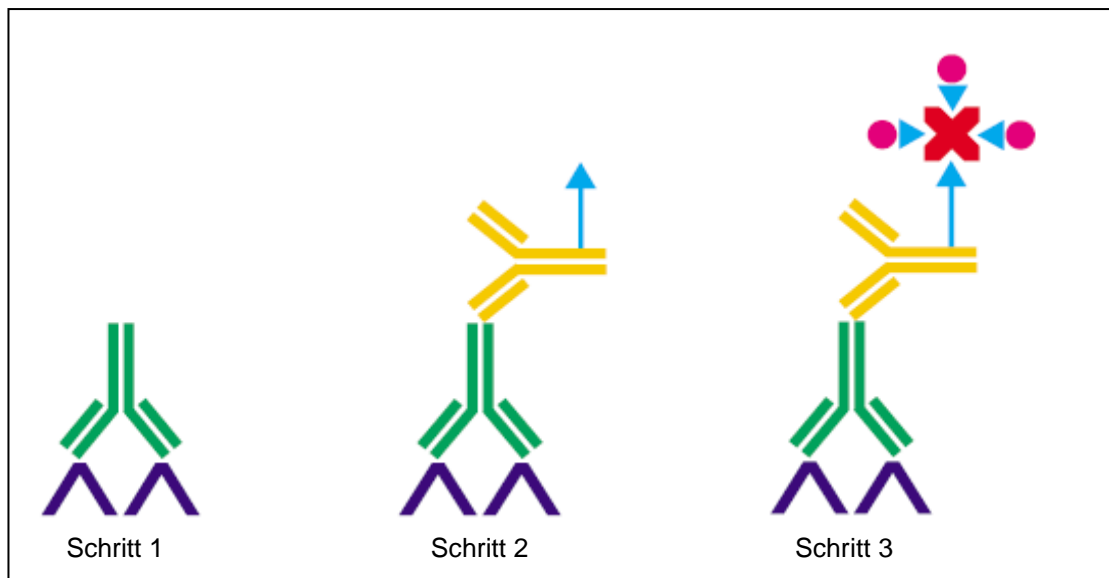


Abb. 6: ABC-POX-Methode in drei Schritten: Primärantikörper (Schritt 1), Sekundärantikörper (Schritt 2), Avidin-Biotin-Enzymkomplex (Schritt 3) (Boenisch T. 2003)

LSAB - Methode

Die Labelled Streptavidin-Biotin-Methode, ebenfalls ein indirektes Färbeverfahren, verläuft in den ersten beiden Reaktionsschritten analog zur ABC-POX-Methode. Nach Auftragen des Primärantikörpers erfolgt in einem zweiten Schritt die Inkubation mit einem biotinylierten Sekundärantikörper, wobei im verwendeten Kit der Sekundärantikörper mittels Spacerarm aus sieben Atomen mit Biotin markiert wurde. So kann jedes biotinylierte Antikörpermolekül mit mehreren Streptavidinmolekülen reagieren und damit die Empfindlichkeit des Systems steigern.

Das verwendete Streptavidin wird aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* isoliert und zeigt gegenüber Avidin weniger unspezifische Reaktionen.

Bei der LSAB-Methode liegt das Streptavidin direkt mit einem Enzym verbunden als Streptavidin-Enzymkonjugat vor. Im vorliegenden Protokoll wird das Enzym alkalische Phosphatase eingesetzt, wobei auch Peroxidase verwendet werden kann. Abbildung 7 zeigt schematisch das immunhistochemische Verfahren in drei Schritten.

Die Farbreaktion erfolgt anschließend mit einem geeigneten Substrat-Chromogen.

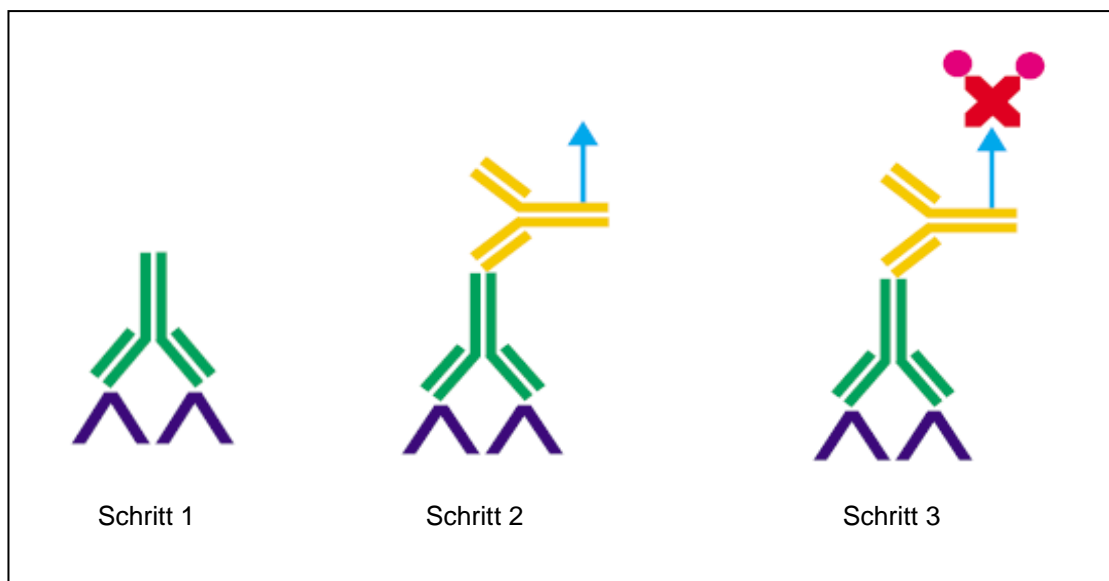


Abb. 7: LSAB-Methode in drei Schritten: Primärantikörper (Schritt 1), biotinylierter Brückenantikörper (Schritt 2), Enzym-markiertes Streptavidin (Schritt 3) (Boenisch T. 2003)

4.2.4. Immunhistochemische Färbung nach der LSAB-Methode

Zu Beginn erfolgt das Entparaffinieren mittels Xylol für 30 Minuten und anschließender Acetonreihe, viermal Aceton, Aceton 2:1 sowie Aceton 1:2 für je 10 Sekunden. Das anschließende Spülen mit Leitungswasser, A.d. sowie Tris + 0,1% Tween 20 dient der Rehydrierung. Der Zusatz des Detergenz Tween 20 zur Pufferlösung steigert deren Effizienz, indem es die Stringenz erhöht und somit eine mögliche, störende Hintergrundfärbung reduziert wird.

Die Antigendemaskierung erfolgt als HIER –hitzeinduziertes Epitop Retrieval mittels Citratpuffer pH 6. Diese ist nötig, um während der Fixierung entstehende Aldehydvernetzungen aufzuheben. Diese Vernetzungen, meistens mit Formalin, können die dreidimensionale Struktur des Antigens verändern.

Bereits zu Beginn wird der Citratpuffer in einer Glasküvette im Wasserbad auf 92,5- 93,5 °C erwärmt. Das Einbringen der Objektträger in die Küvette führt zu einer Abkühlung der Temperatur auf 87- 88,5 °C, so dass mit der eigentlichen Inkubationszeit von 15 Minuten erst ab einer erreichten Temperatur von 90 °C in der Küvette begonnen wird. Diese ist nach vier bis sechs Minuten erreicht.

Anschließend wird die Küvette aus dem Wasserbad entnommen und die Temperatur vor der Weiterbehandlung der Objektträger in der Küvette auf 50 °C

abgekühlt. Nachfolgend spült man die Präparate dreimal für je 10 Sekunden mit A.d. und belässt sie für 10 Minuten in einer Tris + 0,1 % Tween 20 befüllten Küvette. Zur Weiterbehandlung werden die Objektträger in die feuchte Kammer gelegt und die darauf befindlichen Proben mit einem Fettstift umrandet. Um unspezifische Bindungsstellen des biotinylierten Antikörpers zu blockieren wird Blotto-Lösung als Blockiermedium für 30 Minuten verwendet. Nun erfolgt das Auftragen des polyklonalen Primärantikörper Galektin-3 bei einer Verdünnung von 1:100. Als Verdünnungsmedium wird Antibody Diluent verwendet, was gleichzeitig auch zur Befeuchtung der mitgeführten Nullkontrolle dient. Es folgt eine Inkubation mit Galektin-3 für 12 Stunden bei 4 °C über Nacht.

Am Folgetag wird der Primärantikörper zweimal je 10 Sekunden mittels Tris + 0,1 % Tween 20 abgespült. Probe und Nullkontrolle werden nun identisch weiterbehandelt. Nach weiteren 10 Minuten in der Küvette mit Tris + 0,1% Tween 20 trägt man den gebrauchsfertigen Ziege-Anti-Maus/ Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper auf und inkubiert für 30 Minuten.

Anschließend wiederholen sich die Waschschritte mit Tris + 0,1% Tween 20. An alkalische Phosphatase konjugiertes Streptavidin, ebenfalls gebrauchsfertig, wird auf die Objektträger pipettiert und für 30 Minuten belassen.

Erneut werden die Präparate mit Tris + 0,1% Tween 20 gespült.

Unter mikroskopischer Sichtkontrolle erfolgt die Inkubation mit Fast Red für sechseinhalb bis sieben Minuten. Dieses darf maximal 20 Minuten vorher aus den einzelnen Komponenten in einem bestimmten Mischungsverhältnis pipettiert werden. Zu einer entsprechenden Menge Substratpuffer werden nacheinander die drei einzelnen Chromogene in gleicher Menge zugegeben. Zwischen den einzelnen Schritten muss das Gemisch mittels Vortexer vermischt werden. Des Weiteren ist dem Substratpuffer Levamisole zuzugeben. Dies dient der Blockierung der endogenen alkalischen Phosphatase. Zum Abspülen wird A.d. verwendet. Alle Inkubationsschritte erfolgen in der feuchten Kammer. Das Kit wird bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Für die Gegenfärbung werden die Objektträger für fünf Sekunden in Hämalaulösung getaucht, fünf Minuten mit Leitungswasser gebläut und weitere fünf Minuten in A.d. gewässert. Hauptanliegen der Gegenfärbung ist die Kontrasterhöhung, um die Beurteilung des Färbeergebnisses zu verbessern.

Abschließend werden die Objektträger mit Aquatex eingedeckt.

4.2.5. Verwendete Reagenzien

Die verwendeten Reagenzien sind Tabelle 1 zu entnehmen. Zur Verdünnung der Tris-Stocklösung werden zu je 100 ml Stocklösung 900 ml A.d. gegeben. Nach der pH-Wert-Einstellung auf 7,6 ist diese gebrauchsfertig. Zur Herstellung der Blotto-Lösung werden 50 ml TBS, 0,5 g Blotto und 50 µg Tween 20 mittels Vortexer vermischt. Die Haltbarkeit beträgt bei Lagerung im Kühlschrank bei 6°C vier Wochen. Vor Gebrauch muss die Lösung erneut mittels Vortexer vermischt werden. Die Häkalaunlösung wird vor Verwendung 1:1 mit A.d. verdünnt.

Tabelle 1: Verwendete Materialien zur Immunhistochemie

Reagenz	Hersteller
Galectin-3 (H-160): sc-20157	Santa Cruz Biotechnology,
Dako REAL Biotinylated Secondary Antibodies	Dako REAL Detection System Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse Dako Cytomation, Carpinteria, USA
Dako REAL Streptavidin Alkaline Phosphatase	
Dako REAL Chromogen	
Dako REAL AP Substrate Buffer	
Dako REAL Levamisole	
Antibody Diluent with background reducing components	Dako Corporation, Carpinteria, USA
Dako Tween 20	Dako Corporation, Carpinteria, USA
Target Retrieval Solution Citrate pH 6 (×10)	Dako Corporation, Carpinteria, USA
Aceton (J.T. Baker)	Mallinckrodt Baker B. V., Deventer, Holland
Xylol Isomerengemisch	Riedel-de Haen Sigma Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Mayers Häkalaunlösung	Merck, Darmstadt, Germany
Microscopy Aquatex	Merck, Darmstadt, Germany
Tris-HCl-Puffer (×10) -Stocklösung	Apotheke, Klinikum FSU Jena
Blotto (Magermilchpulver)	Merck, Darmstadt, Germany

4.3. Qualitative und quantitative Analyseverfahren

4.3.1. Qualitative und semiquantitative Expressionsbestimmung

Bei 20-100 facher Vergrößerung wird im Hellfeldmikroskop (Axioskop, Zeiss, Jena, Deutschland) die Verteilung und Expression von Galektin-3 im subepithelialen Bindegewebe beurteilt. Zur Quantifizierung des Expressionsgrades werden je Probe drei Gesichtsfelder bei 40-facher Vergrößerung betrachtet. Mittels der AxioCam MRc 5 und dem Softwareprogramm Carl Zeiss AxioVision Release 4.5 werden drei repräsentative Gesichtsfelder digitalisiert. Zur Ermittlung des labelling index erfolgt die Auszählung der Zellzahl pro Gesichtsfeld nach der Methode des randomisierten, systematischen subsamplings (Weibel 1989). Hierbei wird das Verhältnis der Galektin-3-exprimierenden Zellen zur Gesamtzellzahl je Bildausschnitt ermittelt. Zur Zählung wird ein Gitternetz mit cm-Einteilung verwendet. Die Zellzahlen liegen pro Bildausschnitt im Median bei 300 ± 50 .

Um eine objektive Zählung zu gewährleisten, erfolgt diese blind. Dem Zählenden sind Lokalisation, Tag, eventuelle Bestrahlung und Antikörperapplikation nicht bekannt.

4.3.2. Statistische Analyse

Für die qualitative Analyse wird der labelling index je Gesichtsfeld, Probe, Tier und Tag für Donorregion, bestrahltes Halsgewebe sowie Übergangsbereich zwischen Transplantat und Transplantatlager errechnet. Die Daten werden nach Lokalisation, Tag, Probenregion und Behandlungsmodalität zusammengefasst. Ohne Annahme einer Normalverteilung werden Median, Standardabweichung und Interquartilsbereich (25- und 75-Perzentile) bestimmt. Die grafische Darstellung erfolgt mittels Boxplots. Zur Prüfung der Unterschiede zwischen den Gruppen wird der ANOVA-Test auf dem Signifikanzniveau $p < 0,05$ durchgeführt. Alle Berechnungen erfolgen mit dem Programm SPSS 11.0 (Student Version) für Windows (SPSS Inc., Chicago, USA).

5. Ergebnisse

5.1. Tierexperimentelle Ergebnisse

Alle Tiere überleben im Untersuchungszeitraum. Bei den unbestrahlten Tieren zeigt sich bei 7 von 8 eine klinisch komplikationslose Einheilung (Erfolgsrate: 88%). In einem Fall treten partielle Wundheilungsstörungen auf. Im vorbestrahlten Lager hingegen beträgt die Rate der komplikationslosen Einheilung 77%. Sechs bestrahlte Tiere zeigen partielle Wundheilungsstörungen, vier Transplantate gehen bei bestrahlten Tieren verloren. Die zusätzliche Applikation von anti-TGF β führt nicht zu höheren Verlustraten und Wundheilungsstörungen.

5.2. Qualitative immunhistologische Ergebnisse

5.2.1. Expression von Galektin-3 im unbestrahlten Gewebe

Im subepithelialen Gewebe der Leistenregion zeigen sich am Operationstag und 14. postoperativen Tag vereinzelt Galektin-3 exprimierende Zellen. Abb. 8 zeigt subepitheliales Gewebe der Leistenregion am Operationstag. In Abb. 9 ist subepitheliales Gewebe der Donorregion am 14. postoperativen Tag zu sehen. Ein Expressionsanstieg im Wundheilungsverlauf ist nicht erkennbar.

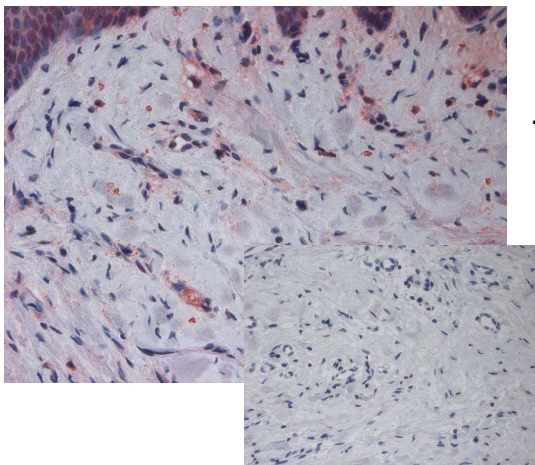


Abb. 8: Galektin-3-Expression der Leistenregion am Operationstag

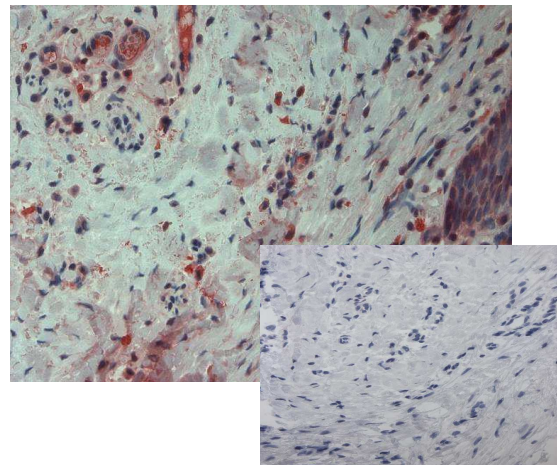


Abb. 9: Galektin-3-Expression der Leistenregion am 14. postoperativen Tag

Im Epithelgewebe wird eine positive Färbung der suprabasalen Epithelschichten deutlich (Abb. 10). Durch die mitgeführte Negativkontrolle ist eine vom Antikörper unabhängige Anfärbung auszuschließen. Positiv angefärbte keratinisierte Haarbälge stellen eine selektive, nicht spezifische Anfärbung dar. Dies ist beim verwendeten Kit möglich.

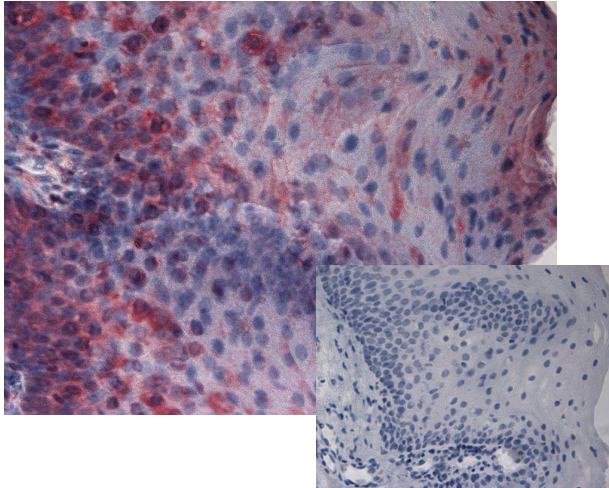


Abb. 10: Epithelexpression im unbestrahlten Gewebe

5.2.2. Expression von Galektin-3 im bestrahlten Gewebe

Auch im bestrahlten Gewebe ist eine Anfärbung der suprabasalen Epithelschichten erkennbar (Abb. 13). Die Expression verhält sich unabhängig von Lokalisation, Tag, Bestrahlung und anti-TGF β -Behandlung. Die zytoplasmatische Galektin-3-Expression ist sowohl vier (Abb. 11) als auch sechs Wochen (Abb. 12) nach Bestrahlung im bestrahlten Halsgewebe sichtbar.

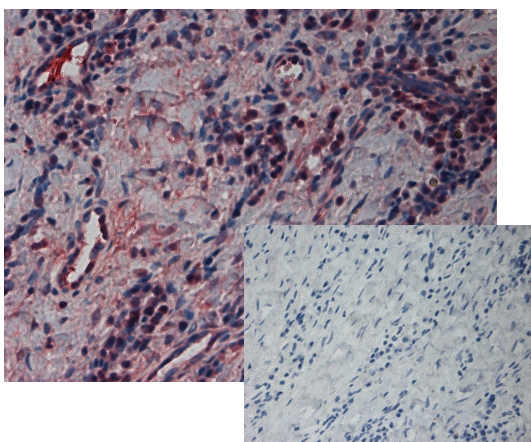


Abb. 11: bestrahltes Halsgewebe am Operationstag

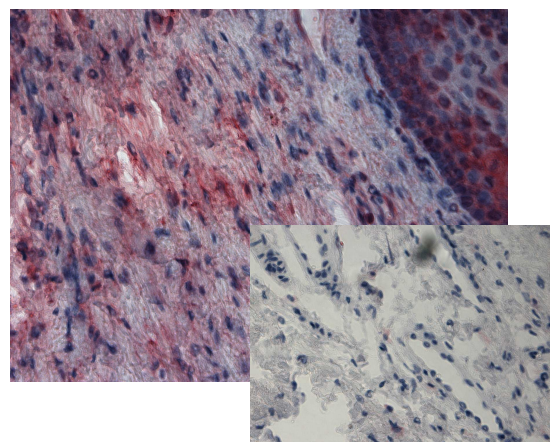


Abb. 12: bestrahltes Halsgewebe am 14. postoperativen Tag

Der Expressionsgrad weist an beiden Untersuchungszeitpunkten große Unterschiede auf. Die Mehrzahl der Proben zeigt eine ausgeprägte subepitheliale Anfärbung.

Im Übergangsbereich zwischen Transplantat und Lager wird ebenfalls eine deutliche zytoplasmatische Färbung beobachtet. Alle Präparate dieser Gruppe weisen ähnliche Expressionsprofile auf (Abb. 13 und 14). Beim Vergleich der Proben mit Antikörperbehandlung und alleiniger Bestrahlung aus dem Übergangsbereich kann kein Unterschied in Intensität und Lokalisation der Galektin-3-Expression festgestellt werden.

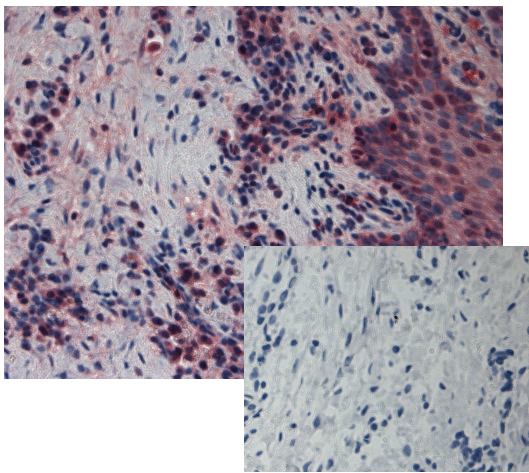


Abb. 13: Übergangsbereich mit anti-TGFβ-Applikation 14. postop. Tag

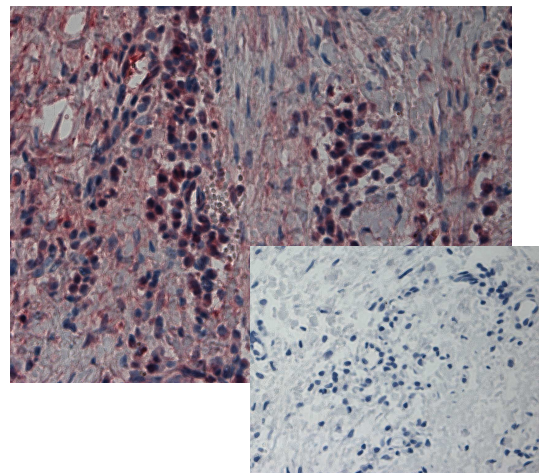


Abb. 14: Übergangsbereich ohne anti-TGFβ-Applikation 14. postop. Tag

5.3. Quantitative Resultate

5.3.1. Galektin-3-Expression im unbestrahlten und bestrahlten Gewebe

Galektin-3 wird im unbestrahlten Gewebe gering exprimiert (Abb.15). Am Operationstag entspricht die Galektin-3-Expression einen labelling index von 1,9 (IQR: 0,8-3,1). Im Wundheilungsverlauf ergibt sich am 14. postoperativen Tag in der unbestrahlten Leistenregion ein labelling index von 1,4 (IQR: 0,4-2,4). Abb.16 vergleicht die Galektin-3-Expression im unbestrahlten und bestrahlten Gewebe. Die vorbestrahlte Halsregion zeigt am Operationstag mit einem labelling index von 72,9 (IQR: 27-85) einen deutlich höheren Expressionsgrad als die Donorregion mit einem labelling index von 1,9 (IQR: 0,8-3,1). Gleiches gilt für den 14. postoperativen Tag. Hier liegt die Expression im bestrahlten Gewebe bei einem Median von 73,2 (IQR: 45-79), im

unbestrahlten Gewebe bei 1,4 (IQR: 0,4-2,4). Die Galektin-3-Expressionswerte am Operationstag und 14. postoperativen Tag, also vier beziehungsweise sechs Wochen nach Bestrahlung, verhalten sich je Lokalisation ähnlich. Im vorbestrahlten Halsgewebe zeigt sich eine große Spannweite der Galektin-3-Expression mit Standardabweichungen von 30,7 am Operationstag und 20,8 am 14. postoperativen Tag. Die Schwankungen im Expressionsgrad sind sechs Wochen nach Bestrahlung reduziert.

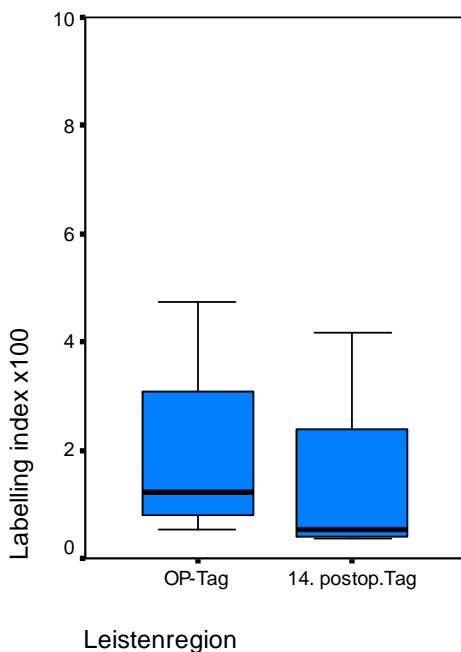


Abb. 15: Expression von Galektin-3 im unbestrahlten Gewebe

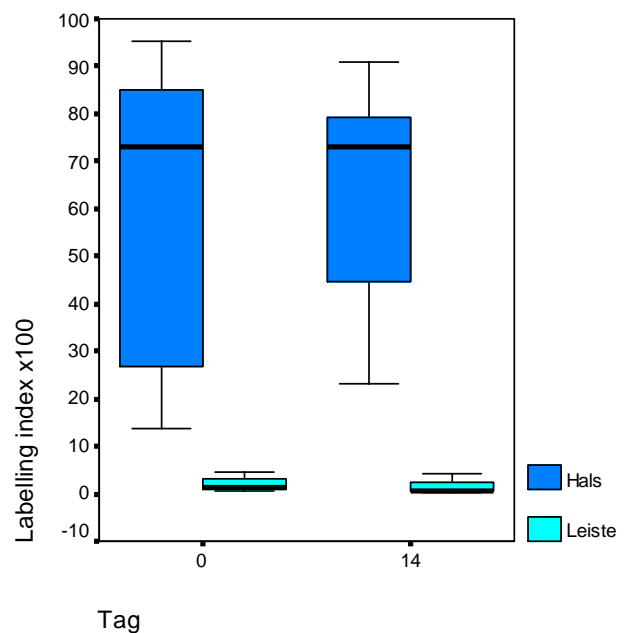


Abb. 16: Vergleich von unbestrahlter Leistenregion und bestrahlter Halsregion

5.3.2. Vergleich der Galektin-3-Expression im Übergangsbereich und im bestrahlten Halsgewebe

Am 14. postoperativen Tag liegt der mediane labelling index im Übergangsbereich zwischen Transplantat und Lager bei 84 (IQR: 76-89). Bei einer Standardabweichung von 8,7 zeigt sich eine konstant hohe Galektin-3-Expression. Betrachtet man vergleichend die bestrahlte Halsregion variieren hier die Werte bei einem labelling index von 73,2 (IQR: 45-79) stark. Im Bereich der Transplantateinheilung in vorbestrahltes Halsgewebe lassen sich im Median höhere Galektin-3-Expressionswerte erkennen (Abb. 17). Eine Signifikanz kann nicht festgestellt werden.

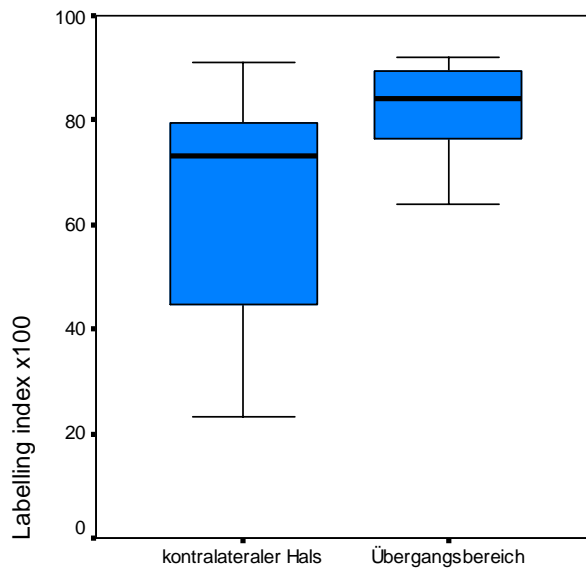


Abb. 17: Vergleich von bestrahlter Halsregion und Übergangsbereich am 14. postoperativen Tag

14. postoperativer Tag

5.3.3. Galektin-3-Expression im Übergangsbereich

Der Einfluss einer anti-TGF β -Applikation in das Transplantatlager auf die Galektin-3-Expression wird durch Vergleich mit unbehandelten Proben aus dem Übergangsbereich untersucht. Alle Proben sind bestrahlt. Ohne Antikörperbehandlung liegt der mediane labelling index am 14. postoperativen Tag im Übergangsbereich zwischen Transplantat und Lager bei 85,3 (IQR: 72-91). Bei vorheriger Antikörperapplikation ergibt sich für die gleiche Probenlokalisation ein labelling index von 84 (IQR: 76-88). Die labelling indices weisen nur eine geringe Schwankung auf. Die Standardabweichung für den 14. postoperativen Tag im antikörperbehandelten Übergangsbereich liegt bei 6,3. Abb. 18 lässt keine signifikanten Unterschiede der Galektin-3-Expression zwischen Bestrahlung mit Antikörperbehandlung und alleiniger Bestrahlung erkennen.

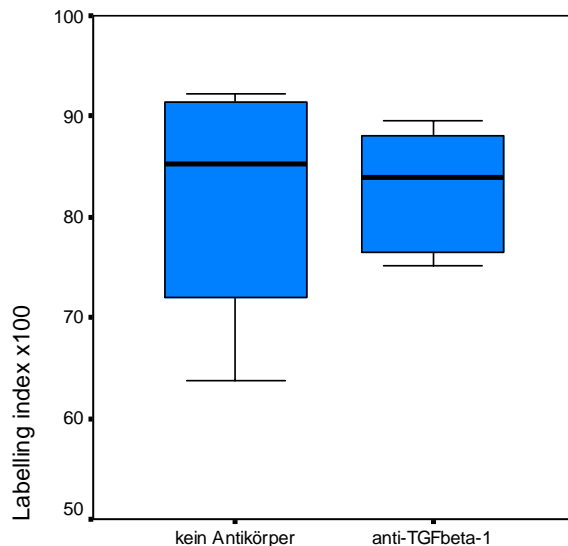


Abb. 18: Galektin-3-Expression mit und ohne anti-TGFβ-Applikation

Übergangsbereich 14. postoperativer Tag

6. Diskussion

6.1. Diskussion Tiermodell

Das Tiermodell der Ratte wird zu experimentellen Untersuchungen von Wundheilung und insbesondere Transplantateinheilung häufig verwendet. Es weist gegenüber anderen Versuchstierspezies Vorteile auf. So besteht eine Vergleichbarkeit der Einheilungsvorgänge bei freien Transplantaten von Ratte und Mensch (Karl et al. 1978). Allerdings ist die Stoffwechselrate im Vergleich zum Menschen um das 4-6fache erhöht (Waynforth 1992). Dies erlaubt die direkte Übertragung der Ergebnisse im Hinblick auf Korrelation von Bestrahlung, Transplantation und Gewebeveränderung nur eingeschränkt. Die etablierten Gesamtreferenzdosen bei Raten liegen zwischen 30-50 Gy (Strnad et al. 1997). Die verwendete Strahlendosis von 40 Gy mit einer Fraktionierung von 4 x 10 Gy ist in Arbeiten zum Modell des freien myokutanen Gracilislapen der Erlanger Forschungsgruppe um Schultze-Mosgau/ Wehrhan untersucht worden (Schultze-Mosgau et al. 2006). Für Untersuchungen zur Einheilung von Weichgewebstransplantaten im unbestrahlten wie bestrahlten Transplantatlager stellt die Ratte ein etabliertes Modell dar (Hammond et al. 1993, Kostakoglu et al. 1997). Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit ist das von Schultze-Mosgau et al etablierte Lappenmodell und die daran durchgeführten Untersuchungen zur Rolle von TGFβ für die Einheilung freier Gewebstransplantate im vorbestrahlten Transplantatlager (Schultze-Mosgau et al. 2002b). Die

Gefäßkaliber von A. und V. femoralis ähneln den Anschlussgefäßen am Hals und können mittels End-zu-End-Anastomosen angeschlossen werden. Die Länge des Gefäßstiels eignet sich mit 1-1,5 cm optimal zum Anschluss an das Transplantatlager.

6.2. Diskussion der immunhistochemischen Verfahren

Bei der ABC- und LSAB-Methode ist keine Signalverstärkung durch Wiederholung wie bei der PAP- bzw APAAP-Methode möglich. Ihre Sensitivität ist jedoch um ein Vielfaches größer (Hsu et al. 1981). Die großen Moleküle der ABC-Methode können zu sterischen Behinderungen führen und somit das positive Signal undeutlich werden lassen. Die Reaktionskomplexe der LSAB-Methode sind kleiner. Ihre Sensitivität liegt vier- bis achtmal höher (Giorno 1984). Das sensitivere Färbeergebnis zeigt sich auch beim polyklonalen Galektin-3-Antikörper. Vorteile des standardisierten Kits sind einfache Handhabung und hohe Reproduzierbarkeit.

Bei der Auswahl des Antikörpers ist auf die Eignung zur Immunhistochemie an Paraffinschnitten geachtet worden. Eine quantitative Aussage über die Proteinmenge von Galektin-3 kann nach Immunhistochemie nicht getroffen werden. Die Immunhistochemie kann nur als Anhalt für den Expressionsgrad dienen. Eine vergleichende Interpretation der Expressionsgrade ist möglich.

6.3. Diskussion der Galektin-3-Expression

6.3.1. Galektin-3-Expression im Gewebe

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Galektin-3 im vorbestrahlten Transplantatlager ebenso wie im bestrahlten, kontralateralen Halsgewebe gegenüber der unbestrahlten Leistenregion eine signifikant erhöhte Expression aufweist. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der von Kasper und Hughes beschriebenen erhöhten Galektin-3-Synthese und –Sekretion während der bestrahlungsinduzierten Lungenfibrose (Kasper und Hughes 1996). Auch für Leber- und Nierenfibrose ist eine erhöhte Galektin-3-Expression gezeigt (Henderson et al. 2006, Henderson et al. 2008).

Für die bestrahlungsinduzierte Lungenfibrose ist eine Reexpression fetaler Antigene mit spezifischem räumlich-zeitlichen Expressionsmuster nachgewiesen. Auch Galektin-3 zeigt eine transiente epitheliale

Immunreaktivität. Kasper und Fehrenbach vermuten ähnliche Regulationsmechanismen bei der Differenzierung des Epithels während der Ontogenese und Umbauprozessen während der Fibrogenese (Kasper und Fehrenbach 2000).

In der durchgeführten Immunhistochemie zeigt sich im bestrahlten Gewebe eine zytoplasmatische Markierung der Fibroblasten im subepithelialen Gewebe. Diese fehlt im unbestrahlten Gewebe fast vollständig. Eine Regulation ähnlich fetaler Differenzierungsprozesse ist denkbar. Auch die epitheliale-mesenchymale Transition, die an der Fibrogenese beteiligt ist, stellt einen Mechanismus dar, der ursprünglich aus der Embryonalentwicklung bekannt ist. Eine Beteiligung der EMT an der Entstehung der Strahlenfibrose ist nachgewiesen. Andarawewa et al haben gezeigt, dass Bestrahlung gesunde humane Epithelzellen sensibilisiert. Sie entwickeln im Rahmen der EMT einen mesenchymalen Phänotyp (Andarawewa et al. 2007).

Galektin-3 ist als Marker im Rahmen epithelialer Differenzierungsprozesse nachgewiesen (Plzak et al. 2002). Anhand der wissenschaftlichen Fakten kann vermutet werden, dass Galektin-3 als EMT-beteiligtes Glycoprotein zu werten ist. Die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Galektin-3 und EMT kann als Ziel zukünftiger Forschungsarbeiten erhebliche Fortschritte in der Galektin-3-Forschung erzielen.

In allen untersuchten Gewebeproben lässt sich eine positive Galektin-3-Expression in den suprabasalen Epithelschichten erkennen. Dies stimmt mit den Angaben von Plzak et al überein. Die Arbeitsgruppe hat in normalem Epithel und epithelialen Tumorzellen eine suprabasale Galektin-3-Bindung festgestellt, wobei die Affinität von Galektin-3 mit dem Differenzierungsgrad korreliert (Plzak et al. 2000). Eine stärkere Epithelexpression im bestrahlten Gewebe im Vergleich mit dem unbestrahlten Gewebe lässt sich mittels immunhistochemischer Färbung nicht nachweisen, da mittels Immunhistochemie keine quantitative Aussage über die Proteinmenge möglich ist. Diese ist aber denkbar.

6.3.2. Galektin-3 und TGF β

Die Forschungsgruppe um Schultze-Mosgau/ Wehrhan hat nach Applikation des Antikörpers anti-TGF β_1 eine signifikante Reduktion der Expressionsprofile von TGF β_1 im Wundheilungsprozess zeigen können. Die Antikörperbehandlung erzielt im bestrahlten Gewebe neben verminderter TGF β_1 -Expression eine Reduktion der Smad3-Proteinkonzentration wie eine Reduktion der ECM-Synthese (Schultze-Mosgau et al. 2004).

In der vorliegenden Arbeit verhält sich die Galektin-3-Expression im vorbestrahlten Transplantatlager am 14. postoperativen Tag unabhängig von der Anwendung des TGF β_1 -Antikörpers. Die Modulation des TGF β -Signalweges durch neutralisierende Antikörper scheint ohne Wirkung auf die Galektin-3-Konzentration. Dies lässt einen direkten Einfluss von TGF β_1 auf die Galektin-3-Expression unwahrscheinlich erscheinen. Am Modell der Leber- und Nierenfibrose zeigen sich für Galektin-3 γ/γ Maus und den Wildtyp ähnliche TGF β -Expressionslevel sowie Smad2- und 3-Aktivierung. Kollagendeposition und α -SMA als Marker der Myofibroblastenaktivierung sind reduziert. Henderson et al beschreiben eine Modulation durch Galektin-3 bei der TGF β -vermittelten Myofibroblastenaktivierung sowie der Matrixproduktion (Henderson et al. 2006, Henderson et al. 2008).

Der Regulationsmechanismus ist unbekannt. In der Literatur finden sich vereinzelt Untersuchungen zur Galektin-3-TGF β -Beziehung.

Eine vollständige Fibrosehemmung mittels anti-TGF β -Antikörper ist bisher nicht erzielt worden. Auch andere Signalwege beeinflussen die Fibroseentwicklung maßgeblich. Galektin-3 wird als profibrotisches Protein erst seit kurzer Zeit untersucht. Seine Rolle in der Fibrogenese ist weitgehend unklar. Die Ergebnisse lassen eine TGF β -unabhängige Regulation vermuten. Dies schließt eine Modulation des TGF β -Signalweges durch Galektin-3 jedoch nicht aus.

6.3.3. Galektin-3 in der Signaltransduktion

In ruhenden Fibroblastenkulturen liegt eine weitgehend zytoplasmatische Lokalisation von Galektin-3 vor. Proliferierende Fibroblastenkulturen zeigen erhöhte Galektin-3-Expression mit vorwiegend nuklearer Lokalisation (Moutsatsos et al. 1987). Dies deutet eine Beteiligung an Signaltransduktion und Transkription an. Galektin-3 ist im Wnt-Signalweg als Bindungspartner von β -catenin bekannt. Der Wnt-Signalweg spielt eine Rolle in embryonaler Organ- und Gewebeentwicklung sowie Onkogenese. Eine Beteiligung an der epithelialen-mesenchymalen Transition ist nachgewiesen. Die Aktivierung von Slug, direktes Transkriptionsziel von β -catenin/TCF und die Stabilisation von snail sind Bestandteil der Wnt/ β -catenin induzierten EMT (Larue und Bellacosa 2005). Die Galektin-3- β -catenin-Interaktion ist im Cytoplasma und im Kern von Krebszellen nachgewiesen und führt zur Aktivierung von TCF. Der C-terminale Anteil des Galektin-3 interagiert mit dem NH₂-Terminus von β -catenin (Shimura et al. 2004). Während der Proliferationsphase der Wundheilung ist die β -catenin/TCF-abhängige Transkriptionsaktivität in Fibroblasten erhöht (Cheon et al. 2002). Die Proliferation in β -catenin-null-Fibroblasten kann durch TGF β nicht angeregt werden (Cheon et al. 2006). Analog ist bei gleich bleibender TGF β -Expression eine Reduktion von Fibrose von Leber und Niere bei Galektin-3^{-/-} Maus gezeigt. Dies lässt gleiche Regulationswege vermuten und unterstützt die Hypothese der Galektin-3- β -catenin-Interaktion im Rahmen der Fibroseentwicklung. Weitere Interaktionen zwischen Wnt- und TGF β -Signalweg sind bekannt. Eine Assoziation von Smad3/4 mit β -Catenin nach TGF β -Stimulation in Epithelzellen des proximalen Tubulus ist nachgewiesen (Tian und Phillips 2002). Medici et al vermuten einen Einfluss der Smad-Proteine auf die β -catenin/LEF1-induzierte EMT (Medici et al. 2006).

GSK3 β komplexiert mit CK1 α (Casein Kinase 1), APC (adenomatous polyposis coli gene) und axin, phosphoryliert β -catenin und ermöglicht die Ubiquitination und den Abbau im Proteasom. Untersuchungen haben eine Galektin-3-Axin-Interaktion zeigen können. Ähnlich β -catenin ist eine Axin unterstützte GSK3 β -abhängige Phosphorylierung von Galektin-3 möglich (Shimura et al. 2005). Galektin-3 zeigt die gleiche Regulation wie β -catenin. Die Ergebnisse zeigen eine Galektin-3-Beteiligung am Wnt-Signalweg und lassen Interaktionen im Rahmen der Fibrogenese vermuten.

Weitere Signalproteine interagieren mit dem Glycoprotein Galektin-3. Für die UVB-induzierte Apoptose von Keratinocyten ist eine Unterstützung der Akt-Aktivierung durch Galektin-3 gezeigt. Dies führt zur Reduktion der Apoptoserate (Saegusa et al. 2008). Im Rahmen der EMT wird Akt via PI3K durch TGF β aktiviert (Larue und Bellacosa 2005). Auch andere Aktivierungswege deuten sich an. Möglicherweise ist auch hier eine Beteiligung von Galektin-3 gegeben. Für die Induktion von Galektin-3 durch UV-Licht zeigt sich eine Beteiligung von NF κ B. Die Promotorregion für das humane Galektin-3-Gen beinhaltet zwei mögliche NF κ B-Bindungsseiten. NF κ B ist an Fibroseentwicklung und EMT beteiligt. Es kann eine Galektin-3-Aktivierung durch NF κ B vermutet werden. Abbildung 19 zeigt einen Überblick der Galektin-3-Interaktionen in der Signaltransduktion.

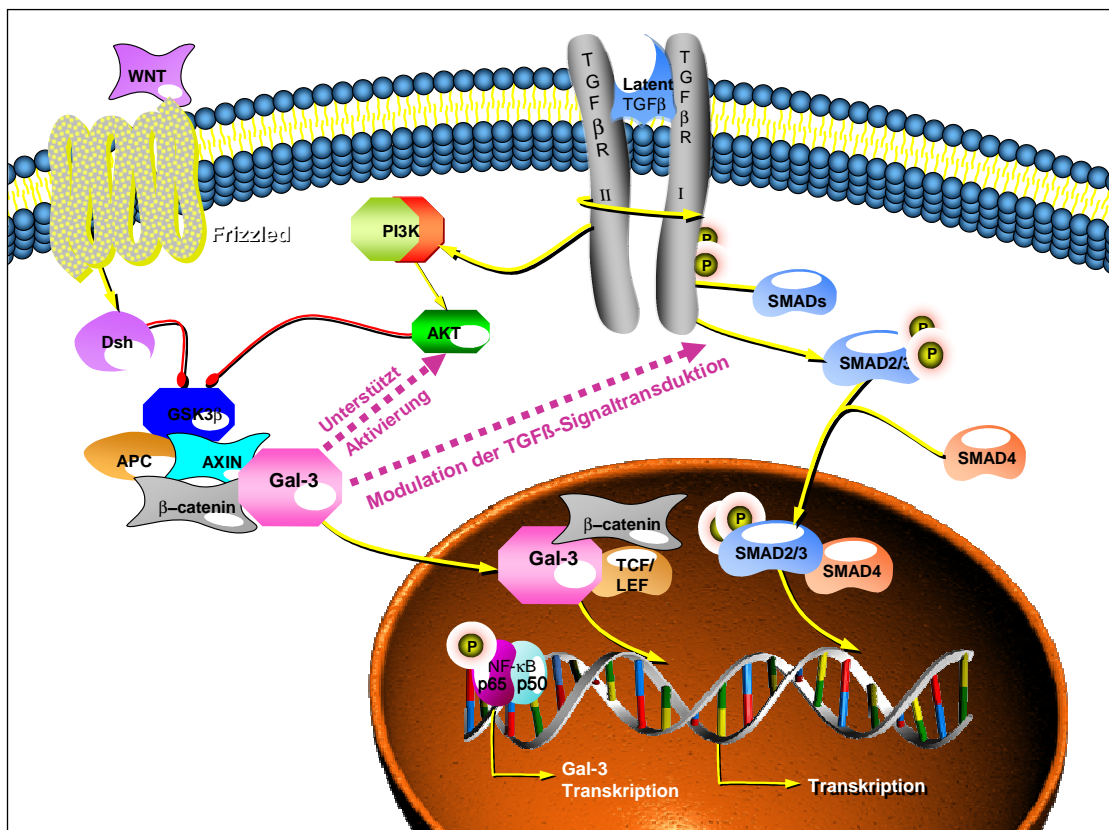


Abb. 19: Galektin-3 in der Signaltransduktion

7. Schlussfolgerung

Bisher bestehen nur vereinzelt Forschungsarbeiten, die sich mit Galektin-3 und Fibrose beschäftigen. Die vorliegende Dissertation hat zeigen können, dass die Reduktion der TGF β -Expression durch entsprechende Antikörper die Galektin-3-Expression unbeeinflusst lässt. Ein TGF β -unabhängiger Regulationsmechanismus wird geschlussfolgert.

Die Funktion von Galektin-3 in der Fibrogenese ist weitgehend unverstanden. Es deuten sich in Arbeiten von Hughes und Henderson et al wichtige Funktionen an. Die Relativierung der bisherigen Sichtweise mit TGF β als Schlüsselprotein der Fibroseentwicklung ist denkbar.

Galektin-3-Interaktionen mit Akt, NF κ B sowie β -catenin und axin im Wnt-Signalweg sind bekannt. Diese sind ebenso Bestandteil der EMT-vermittelten Fibrogenese. Eine mögliche Beteiligung von Galektin-3 im Rahmen dieses komplexen Prozesses müssen weitere Untersuchungen klären.

8. Literaturverzeichnis

- Acland RD. 1974. Microvascular anastomosis: a device for holding stay sutures and a new vascular clamp. *Surgery*, 75 (2):185-187.
- Acosta-Rodriguez EV, Montes CL, Motran CC, Zuniga EI, Liu FT, Rabinovich GA, Gruppi A. 2004. Galectin-3 mediates IL-4-induced survival and differentiation of B cells: functional cross-talk and implications during *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol*, 172 (1):493-502.
- Agrwal N, Sun Q, Wang SY, Wang JL. 1993. Carbohydrate-binding protein 35. I. Properties of the recombinant polypeptide and the individuality of the domains. *J Biol Chem*, 268 (20):14932-14939.
- Ahmad N, Gabius HJ, Andre S, Kaltner H, Sabesan S, Roy R, Liu B, Macaluso F, Brewer CF. 2004. Galectin-3 precipitates as a pentamer with synthetic multivalent carbohydrates and forms heterogeneous cross-linked complexes. *J Biol Chem*, 279 (12):10841-10847.
- Aitasalo K, Relander M, Virolainen E. 1997a. Microvascular free tissue transfers after preoperative irradiation in head and neck reconstructions. *Acta Otolaryngol Suppl*, 529:247-250.
- Aitasalo K, Relander M, Virolainen E. 1997b. The success rate of free flaps after preoperative irradiation in head and neck reconstruction. *Ann Chir Gynaecol*, 86 (4):311-317.
- Andarawewa KL, Erickson AC, Chou WS, Costes SV, Gascard P, Mott JD, Bissell MJ, Barcellos-Hoff MH. 2007. Ionizing radiation predisposes nonmalignant human mammary epithelial cells to undergo transforming growth factor beta induced epithelial to mesenchymal transition. *Cancer Res*, 67 (18):8662-8670.
- Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, Gitt MA, Hirabayashi J, Hughes C, Kasai K, et al. 1994. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell*, 76 (4):597-598.
- Boenisch T. FAJ, Stead R.H., Key M. 2003. Immunhistochemische Färbemethoden. Carpinteria; Hamburg: DakoCytomation Corp.
- Boutet A, Esteban MA, Maxwell PH, Nieto MA. 2007. Reactivation of Snail genes in renal fibrosis and carcinomas: a process of reversed embryogenesis? *Cell Cycle*, 6 (6):638-642.
- Cheon SS, Cheah AY, Turley S, Nadesan P, Poon R, Clevers H, Alman BA. 2002. beta-Catenin stabilization dysregulates mesenchymal cell proliferation, motility, and invasiveness and causes aggressive fibromatosis and hyperplastic cutaneous wounds. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (10):6973-6978.

- Cheon SS, Wei Q, Gurung A, Youn A, Bright T, Poon R, Whetstone H, Guha A, Alman BA. 2006. Beta-catenin regulates wound size and mediates the effect of TGF-beta in cutaneous healing. *FASEB J*, 20 (6):692-701.
- Cortegano I, del Pozo V, Cardaba B, de Andres B, Gallardo S, del Amo A, Arrieta I, Jurado A, Palomino P, Liu FT, Lahoz C. 1998. Galectin-3 down-regulates IL-5 gene expression on different cell types. *J Immunol*, 161 (1):385-389.
- Dormand EL, Banwell PE, Goodacre TE. 2005. Radiotherapy and wound healing. *Int Wound J*, 2 (2):112-127.
- Dumic J, Dabelic S, Flogel M. 2006. Galectin-3: an open-ended story. *Biochim Biophys Acta*, 1760 (4):616-635.
- Elliott MJ, Strasser A, Metcalf D. 1991. Selective up-regulation of macrophage function in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor transgenic mice. *J Immunol*, 147 (9):2957-2963.
- Furtak V, Hatcher F, Ochieng J. 2001. Galectin-3 mediates the endocytosis of beta-1 integrins by breast carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 289 (4):845-850.
- Giorno R. 1984. A comparison of two immunoperoxidase staining methods based on the avidin-biotin interaction. *Diagn Immunol*, 2 (3):161-166.
- Gritzmacher CA, Mehl VS, Liu FT. 1992. Genomic cloning of the gene for an IgE-binding lectin reveals unusual utilization of 5' untranslated regions. *Biochemistry*, 31 (40):9533-9538.
- Hammond DC, Brooksher RD, Mann RJ, Beernink JH. 1993. The dorsal skin-flap model in the rat: factors influencing survival. *Plast Reconstr Surg*, 91 (2):316-321.
- Hay ED. 1995. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)*, 154 (1):8-20.
- Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Poirier F, Russo FP, Iredale JP, Haslett C, Simpson KJ, Sethi T. 2006. Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. *ProcNatlAcadSciUSA*, 103 (13):5060-5065.
- Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Kipari T, Haslett C, Iredale JP, Liu FT, Hughes J, Sethi T. 2008. Galectin-3 expression and secretion links macrophages to the promotion of renal fibrosis. *Am J Pathol*, 172 (2):288-298.
- Hsu DK, Zuberi RI, Liu FT. 1992. Biochemical and biophysical characterization of human recombinant IgE-binding protein, an S-type animal lectin. *J Biol Chem*, 267 (20):14167-14174.

- Hsu SM, Raine L, Fanger H. 1981. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*, 29 (4):577-580.
- Hughes RC. 1999. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1473 (1):172-185.
- Ikegami T, Zhang Y, Matsuzaki Y. 2007. Liver fibrosis: possible involvement of EMT. *Cells Tissues Organs*, 185 (1-3):213-221.
- Inohara H, Akahani S, Raz A. 1998. Galectin-3 stimulates cell proliferation. *Exp Cell Res*, 245 (2):294-302.
- Kadrofske MM, Openo KP, Wang JL. 1998. The human LGALS3 (galectin-3) gene: determination of the gene structure and functional characterization of the promoter. *Arch Biochem Biophys*, 349 (1):7-20.
- Kalluri R, Neilson EG. 2003. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest*, 112 (12):1776-1784.
- Karl P, Heiner H, Tilgner-Peter A. 1978. [Free skin-adipose tissue flap transplantation in rats]. *Z Exp Chir*, 11 (4):251-257.
- Kasper M, Hughes RC. 1996. Immunocytochemical evidence for a modulation of galectin 3 (Mac-2), a carbohydrate binding protein, in pulmonary fibrosis. *JPathol*, 179 (3):309-316.
- Kasper M, Fehrenbach H. 2000. Immunohistochemical evidence for the occurrence of similar epithelial phenotypes during lung development and radiation-induced fibrogenesis. *Int J Radiat Biol*, 76 (4):493-501.
- Kim K, Mayer EP, Nachtigal M. 2003. Galectin-3 expression in macrophages is signaled by Ras/MAP kinase pathway and up-regulated by modified lipoproteins. *Biochim Biophys Acta*, 1641 (1):13-23.
- Klug C, Berzaczy D, Reinbacher H, Voracek M, Rath T, Millesi W, Ewers R. 2006. Influence of previous radiotherapy on free tissue transfer in the head and neck region: evaluation of 455 cases. *Laryngoscope*, 116 (7):1162-1167.
- Knibbs RN, Agrwal N, Wang JL, Goldstein IJ. 1993. Carbohydrate-binding protein 35. II. Analysis of the interaction of the recombinant polypeptide with saccharides. *J Biol Chem*, 268 (20):14940-14947.
- Kostakoglu N, Manek S, Green CJ. 1997. The development of neovascularisation in flap perfabrication with vascular implantation: an experimental study. *Br J Plast Surg*, 50 (6):428-434.
- Krzeslak A, Lipinska A. 2004. Galectin-3 as a multifunctional protein. *Cell Mol Biol Lett*, 9 (2):305-328.

- Kuwabara I, Liu FT. 1996. Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin. *J Immunol*, 156 (10):3939-3944.
- Larue L, Bellacosa A. 2005. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene*, 24 (50):7443-7454.
- Lippert E, Falk W, Bataille F, Kaehne T, Naumann M, Goeke M, Herfarth H, Schoelmerich J, Rogler G. 2007. Soluble galectin-3 is a strong, colonic epithelial-cell-derived, lamina propria fibroblast-stimulating factor. *Gut*, 56 (1):43-51.
- Liu FT, Hsu DK, Zuberi RI, Kuwabara I, Chi EY, Henderson WR, Jr. 1995. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. *Am J Pathol*, 147 (4):1016-1028.
- Liu Y. 2004. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol*, 15 (1):1-12.
- Medici D, Hay ED, Goodenough DA. 2006. Cooperation between snail and LEF-1 transcription factors is essential for TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Mol Biol Cell*, 17 (4):1871-1879.
- Moutsatsos IK, Wade M, Schindler M, Wang JL. 1987. Endogenous lectins from cultured cells: nuclear localization of carbohydrate-binding protein 35 in proliferating 3T3 fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84 (18):6452-6456.
- Muller K, Meineke V. 2007. Radiation-induced alterations in cytokine production by skin cells. *Exp Hematol*, 35 (4 Suppl 1):96-104.
- Nangia-Makker P, Honjo Y, Sarvis R, Akahani S, Hogan V, Pienta KJ, Raz A. 2000. Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. *Am J Pathol*, 156 (3):899-909.
- Neidhart M, Zaucke F, von Knoch R, Jungel A, Michel BA, Gay RE, Gay S. 2005. Galectin-3 is induced in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts after adhesion to cartilage oligomeric matrix protein. *Ann Rheum Dis*, 64 (3):419-424.
- Nishi Y, Sano H, Kawashima T, Okada T, Kuroda T, Kikkawa K, Kawashima S, Tanabe M, Goto T, Matsuzawa Y, Matsumura R, Tomioka H, Liu FT, Shirai K. 2007. Role of galectin-3 in human pulmonary fibrosis. *Allergolnt*, 56 (1):57-65.
- Ochieng J, Platt D, Tait L, Hogan V, Raz T, Carmi P, Raz A. 1993. Structure-function relationship of a recombinant human galactoside-binding protein. *Biochemistry*, 32 (16):4455-4460.

- Plzak J, Smetana K, Jr., Betka J, Kodet R, Kaltner H, Gabius HJ. 2000. Endogenous lectins (galectins-1 and -3) as probes to detect differentiation-dependent alterations in human squamous cell carcinomas of the oropharynx and larynx. *Int J Mol Med*, 5 (4):369-372.
- Plzak J, Holikova Z, Smetana K, Jr., Dvorankova B, Hercogova J, Kaltner H, Motlik J, Gabius HJ. 2002. Differentiation-dependent glycosylation of cells in squamous cell epithelia detected by a mammalian lectin. *Cells Tissues Organs*, 171 (2-3):135-144.
- Raimond J, Zimonjic DB, Mignon C, Mattei M, Popescu NC, Monsigny M, Legrand A. 1997. Mapping of the galectin-3 gene (LGALS3) to human chromosome 14 at region 14q21-22. *Mamm Genome*, 8 (9):706-707.
- Saegusa J, Hsu DK, Liu W, Kuwabara I, Kuwabara Y, Yu L, Liu FT. 2008. Galectin-3 Protects Keratinocytes from UVB-Induced Apoptosis by Enhancing AKT Activation and Suppressing ERK Activation. *J Invest Dermatol*.
- Saika S, Kono-Saika S, Ohnishi Y, Sato M, Muragaki Y, Ooshima A, Flanders KC, Yoo J, Anzano M, Liu CY, Kao WW, Roberts AB. 2004. Smad3 signaling is required for epithelial-mesenchymal transition of lens epithelium after injury. *Am J Pathol*, 164 (2):651-663.
- Sano H, Hsu DK, Yu L, Apgar JR, Kuwabara I, Yamanaka T, Hirashima M, Liu FT. 2000. Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. *J Immunol*, 165 (4):2156-2164.
- Sato S, Ouellet N, Pelletier I, Simard M, Rancourt A, Bergeron MG. 2002. Role of galectin-3 as an adhesion molecule for neutrophil extravasation during streptococcal pneumonia. *J Immunol*, 168 (4):1813-1822.
- Schultze-Mosgau S, Keilholz L, Rodel F, Labahn D, Neukam FW. 2001. Experimental model for transplantation of a modified free myocutaneous gracilis flap to an irradiated neck region in rats. *IntJOral MaxillofacSurg*, 30 (1):63-69.
- Schultze-Mosgau S, Erbe M, Keilholz L, Radespiel-Troger M, Wiltfang J, Minge N, Neukam FW. 2000. Histomorphometric analysis of irradiated recipient vessels and transplant vessels of free flaps in patients undergoing reconstruction after ablative surgery. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 29 (2):112-118.
- Schultze-Mosgau S, Grabenbauer GG, Radespiel-Troger M, Wiltfang J, Ries J, Neukam FW, Rodel F. 2002a. Vascularization in the transition area between free grafted soft tissues and pre-irradiated graft bed tissues following preoperative radiotherapy in the head and neck region. *Head Neck*, 24 (1):42-51.

- Schultze-Mosgau S, Wehrhan F, Grabenbauer G, Amann K, Radespiel-Troger M, Neukam FW, Rodel F. 2002b. Transforming growth factor beta1 and beta2 (TGFbeta2 / TGFbeta2) profile changes in previously irradiated free flap beds. *Head Neck*, 24 (1):33-41.
- Schultze-Mosgau S, Blaese MA, Grabenbauer G, Wehrhan F, Kopp J, Amann K, Rodemann HP, Rodel F. 2004. Smad-3 and Smad-7 expression following anti-transforming growth factor beta 1 (TGFbeta1)-treatment in irradiated rat tissue. *RadiotherOncol*, 70 (3):249-259.
- Schultze-Mosgau S, Kopp J, Thorwarth M, Rodel F, Melnychenko I, Grabenbauer GG, Amann K, Wehrhan F. 2006. Plasminogen activator inhibitor-I-related regulation of procollagen I (alpha1 and alpha2) by antittransforming growth factor-beta1 treatment during radiation-impaired wound healing. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 64 (1):280-288.
- Seetharaman J, Kanigsberg A, Slaaby R, Leffler H, Barondes SH, Rini JM. 1998. X-ray crystal structure of the human galectin-3 carbohydrate recognition domain at 2.1-A resolution. *J Biol Chem*, 273 (21):13047-13052.
- Sharma UC, Pokharel S, van Brakel TJ, van Berlo JH, Cleutjens JP, Schroen B, Andre S, Crijns HJ, Gabius HJ, Maessen J, Pinto YM. 2004. Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction. *Circulation*, 110 (19):3121-3128.
- Shimura T, Takenaka Y, Tsutsumi S, Hogan V, Kikuchi A, Raz A. 2004. Galectin-3, a novel binding partner of beta-catenin. *Cancer Res*, 64 (18):6363-6367.
- Shimura T, Takenaka Y, Fukumori T, Tsutsumi S, Okada K, Hogan V, Kikuchi A, Kuwano H, Raz A. 2005. Implication of galectin-3 in Wnt signaling. *Cancer Res*, 65 (9):3535-3537.
- Singh B, Cordeiro PG, Santamaria E, Shaha AR, Pfister DG, Shah JP. 1999. Factors associated with complications in microvascular reconstruction of head and neck defects. *Plast Reconstr Surg*, 103 (2):403-411.
- Strnad V, Kamprad F, Jahns J, Meyer M, Bohme R, Madaj-Sterba P, Kirschner M, Sauer R. 1997. [Regression of Yoshida sarcoma during normoxia and hypoxia after fractionated irradiation]. *Strahlenther Onkol*, 173 (3):141-145.
- Takenaka Y, Fukumori T, Raz A. 2004. Galectin-3 and metastasis. *Glycoconj J*, 19 (7-9):543-549.
- Tian YC, Phillips AO. 2002. Interaction between the transforming growth factor-beta type II receptor/Smad pathway and beta-catenin during transforming growth factor-beta1-mediated adherens junction disassembly. *Am J Pathol*, 160 (5):1619-1628.

- Tibbs MK. 1997. Wound healing following radiation therapy: a review. *Radiother Oncol*, 42 (2):99-106.
- Urken ML, Bridger AG, Zur KB, Genden EM. 2001. The scapular osteofasciocutaneous flap: a 12-year experience. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 127 (7):862-869.
- van den Brule F, Califice S, Castronovo V. 2004. Expression of galectins in cancer: a critical review. *Glycoconj J*, 19 (7-9):537-542.
- Verrecchia F, Mauviel A. 2007. Transforming growth factor-beta and fibrosis. *World J Gastroenterol*, 13 (22):3056-3062.
- Waynforth F. 1992. Experimental and surgical technique in the rat. 2 Aufl. London: Academic Press
- Weibel ER. 1989. Measuring through the microscope: development and evolution of stereological methods. *J Microsc*, 155 (Pt 3):393-403.
- Yamaoka A, Kuwabara I, Frigeri LG, Liu FT. 1995. A human lectin, galectin-3 (epsilon bp/Mac-2), stimulates superoxide production by neutrophils. *J Immunol*, 154 (7):3479-3487.
- Yang RY, Hsu DK, Liu FT. 1996. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (13):6737-6742.
- Yanjia H, Xinchun J. 2007. The role of epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma and oral submucous fibrosis. *Clin Chim Acta*, 383 (1-2):51-56.
- Yim KK, Lineaweaver WC, Siko PP, Buncke HJ. 1991. Microvascular transfer of anterior and posterior gracilis muscles in rats. *Microsurgery*, 12 (4):262-267.
- Zuberi RI, Hsu DK, Kalayci O, Chen HY, Sheldon HK, Yu L, Apgar JR, Kawakami T, Lilly CM, Liu FT. 2004. Critical role for galectin-3 in airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *Am J Pathol*, 165 (6):2045-2053.

9. Anhang

9.1. Färbeprotokoll

Färbeprotokoll: **Paraffin-Schnitte**

(angepasst an Dako REAL Detection System)

pAK Galektin-3 (1:100)

Datum:

Bearbeiter:

Arbeitsschritt	Ausführung	Temp. [°C]	Zeit [min]	Bemerkungen
1. vorab	Küvette mit Citratpuffer im WB vorwärmen			
2. Entparaffinieren	Xylol Xylol spülen Acetonreihe 4x spülen Aceton (1:2) Aceton (2:1)	RT	20 10 sec 4x10 sec 10 sec 10 sec	
3. Präparate spülen	Leitungswasser A.d. Tris + 0,1% Tween 20 Tris + 0,1% Tween 20		10 sec 10 sec 10 sec 10	
4. Antidemaskierung	Citratpuffer ph=6 Abkühlen	90 auf 50	15 ~ 23	
5. Präparate spülen	A.d. 3x Tris + 0,1% Tween 20		10 sec 10	
6.	Schnitte mit Fettstift umranden, ab hier Präparate in feuchter Kammer			
7. Blockieren unspez Bindg.-stellen des biotiny. AK	Blockiermedium ABSCHÜTTELN! KEIN TRIS	RT	30	
8. Inkubation mit pAK:	Verdünnungen: 1: 1: K ₀ = nur AK-Verdünnungslösung	4	12-16h	
9. Präparate spülen	Tris + 0,1% Tween 20 2x Tris + 0,1% Tween 20		10 sec 10	
10. Inkubation mit biotiny. sAK:	Dako REAL Biotinylated Secondary Antibodies (gebrauchsfertig)	RT	30	
11. Präparate spülen	Tris + 0,1% Tween 20 2x Tris + 0,1% Tween 20		10 sec 10	
12. Inkubation	Dako REAL Streptavidin Alkaline Phosphatase	RT	30	
13. Präparate spülen	Tris + 0,1% Tween 20 2x Tris + 0,1% Tween 20		10 sec 10	Chromogen ansetzen
14. Inkubation mit Chromogen	Bezeichnung: Dako REAL Fast Red	RT	7	Sichtkontrolle!
15. Präparate spülen	A.d.			
16. Gegenfärbung	Hämalaun (Merck) bläuen mit Leitungswasser wässern in A.d.		5sec 5 5	
17. Eindecken	Aquatex			

9.2. Lebenslauf

Zur Person:

Name:	Anne Kristin Attrodt
Geburtstag:	12.01.1983
Geburtsort:	Sonneberg
Familienstand:	ledig

Schulbildung:

1990-1994	Besuch der Grundschule Oberlind, Sonneberg
1994-2002	Besuch des Arnold-Gymnasiums, Neustadt bei Coburg
2002	Abitur in Neustadt bei Coburg

Studium:

2002-2008	Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Aug - Sept 2004	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Physikum)
seit 2006	Bearbeitung des Dissertationsprojektes in der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie der Universität Jena
Aug 2007 - Juli 2008	Absolvierung des Praktischen Jahres
Okt - Dez 2008	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
seit Okt 2008	Studium der Zahnmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Würzburg, den 17.12.08

9.3. Danksagung

Für die Ermöglichung und Unterstützung bei der Bearbeitung des Dissertationsprojektes danke ich besonders meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. Schultze-Mosgau.

Weiterhin gilt mein Dank Dr. Dr. Falk Wehrhan für die zuverlässige Betreuung über den gesamten Dissertationszeitraum, die konstruktive Kritik und Motivation.

Prof. Dr. Dr. Hyckel verdanke ich Anregungen zur Untersuchung von Galektin-3 im Rahmen der TGF β -Kaskade.

Bei der medizinisch-technischen Assistentin Frau Nora Moll bedanke ich mich für die Einführung in die immunhistochemische Methodik.

PD Dr. Dr. Michael Thorwarth danke ich für die Auswahl und Bereitstellung des klinischen Bildmaterials.

Vor allem danke ich meiner Mutter, die mir immer mit lebensnahen Ratschlägen zur Seite stand und deren Umsetzung mir Schwieriges leichter erschienen ließ.

Ebenso danke ich meinem Freund Sebastian für seine Hilfe und Unterstützung, gerade im „technischen Bereich“, für seine unermüdliche Geduld und für sein Verständnis.

9.4. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. Dr. S. Schultze-Mosgau und Dr. Dr. Falk Wehrhan,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Würzburg, den 17.12.08